

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA

**“SUSCEPTIBILIDAD DEL CUERPO LÚTEO A LA ACCIÓN DE
LA PROSTAGLANDINA $F_{2\alpha}$ EN ALPACAS INDUCIDAS A
OVULACIÓN CON PLASMA SEMINAL”**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Camilo Vicente Mamani Mondragón

Lima – Perú

2014

DEDICATORIA

A Dios todopoderoso, por iluminarnos diariamente por el camino de la sabiduría y el éxito. Al Señor de los Milagros que en momentos difíciles supo darme la tranquilidad para seguir adelante.

A mis padres, Vicente Mamani y Blanca Mondragón, por su incondicional y abnegado esfuerzo para brindarme todos los medios necesarios para ser una persona responsable en la vida. Solo le pido a Dios que me permita tenerlos por muchos años más.

Al famosísimo Repro Team formado por Nathie, Martha, Tito, Fahrid, Jesús, Marco, con los cuales hemos pasado muchas aventuras graciosas estos 2 últimos años. Espero seguir contando con su amistad por siempre.

A toda la familia Mondragón y Mamani, con quienes comparto siempre momentos alegres en cada reunión familiar y permiten que me olvide por un instante de los estudios, que muchas veces era estresante.

AGRADECIMIENTOS

Al maestro Wilfredo Huanca López por su apoyo constante y la confianza puesta en mi persona para concluir el presente trabajo de investigación. Al Dr. Ampuero por su amistad y el entusiasmo que me transmitía en cada conversación. Al grupo de investigadores del INIA, que permitieron el correcto desarrollo de la tesis y por las facilidades brindadas.

Al grupo humano de estudiantes que me apoyó durante el trabajo y fueron hacer prácticas al CIP Quimsachata, en especial a Josías, Juan, Alonso, Diego, Álvaro, Cecibel, Patricia, Ana María, gracias por brindarme su amistad y su apoyo constante en la ejecución del presente trabajo.

A la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM y a los docentes que me transmitieron sus conocimientos y experiencias, las cuales fueron indispensables para mi formación académica y lograr mis objetivos trazados al inicio de mi profesión.

No podía olvidarme de mis tres hermanos políticos, Luis Alonso, Luis David, Víctor. Gracias por estar presente cuando necesitaba hablar con alguien y que parte de la culminación de mi carrera es debido al apoyo brindado en su momento.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE CUADROS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
2.1. Anatomía reproductiva	3
2.2. Fisiología reproductiva de la alpaca hembra	5
2.2.1. Pubertad.....	5
2.2.2. Estacionalidad reproductiva y comportamiento sexual...	6
2.3. Endocrinología de la reproducción	8
2.3.1. Mecanismo neuroendocrino en el control reproductivo....	8
2.3.2. Dinámica folicular.....	11
2.3.3. Ovulación.....	13
2.3.4. Factor Inductor de Ovulación (FIO).....	16
2.3.5. Cuerpo lúteo.....	19
2.3.6. Luteólisis.....	22
III. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1. Lugar de estudio	25
3.2. Animales	25
3.3. Obtención del plasma seminal	26
3.4. Diseño experimental	26
3.4.1. Evaluación ecográfica pre-experimental.....	26
3.4.2. Aplicación del inductor de ovulación.....	26
3.4.3. Evaluación ecográfica para determinar ovulación.....	27
3.4.4. Aplicación de tratamientos.....	27
3.4.5. Toma de muestra.....	28
3.5. Análisis estadístico	28
IV. RESULTADOS	29
V. DISCUSIÓN	37
VI. CONCLUSIONES	40
VII. LITERATURA CITADA	41
VIII. APÉNDICE	48

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar la susceptibilidad del cuerpo lúteo al cloprostenol sódico (análogo sintético de la $\text{PGF}_{2\alpha}$) durante el desarrollo de la fase luteal en alpacas inducidas a ovulación con plasma seminal. El plasma seminal se obtuvo de muestras de semen de alpaca colectadas mediante vagina artificial y diluidas en proporción 1:1 en buffer fosfato salino (PBS), luego fueron centrifugadas y conservadas a -20°C hasta su posterior uso. 96 alpacas hembras con un folículo $\geq 7\text{mm}$ fueron inducidas a ovulación mediante la inyección de plasma seminal ($n=48$) y GnRH ($n=48$). Luego fueron seleccionadas aleatoriamente en 6 grupos distintos: un grupo control y animales tratados con $\text{PGF}_{2\alpha}$ los días 4, 5, 6, 7 y 8 post inducción de ovulación. Se colectaron muestras sanguíneas para determinar los perfiles de progesterona sérica al inicio del tratamiento y 24 horas post-tratamiento con cloprostenol sódico. Los resultados muestran que no hubo efecto de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ en animales tratados el día 4 y 5 ($p>0.05$). Los animales tratados al día 7 y 8 se vieron que responden con una luteólisis efectiva a las 24 horas post- $\text{PGF}_{2\alpha}$, ya que sus niveles de progesterona fueron $<1\text{ng/ml}$. En el día 6 se confirma que hay una luteólisis a las 48 horas post- $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($p<0.05$), por la disminución en el tamaño del diámetro del cuerpo lúteo. Por lo tanto se concluye que el cuerpo lúteo en alpacas inducidas a ovulación con plasmas seminal es susceptible a la luteólisis a partir del día 6 post-estímulo de ovulación.

Palabras claves: alpacas, cuerpo lúteo, plasma seminal, prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$,

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the susceptibility of the corpus luteum to cloprostenol sodium (synthetic analog of $\text{PGF}_{2\alpha}$) during development of the luteal phase in alpacas-induced ovulation with seminal plasma. Semen was collected from male alpacas using an artificial vagina and then were diluted 1/1 with phosphate buffered saline (PBS), centrifuged and stored at -20°C before the experiment. Females alpacas ($n=96$) were induced to ovulate by injecting seminal plasma ($n=48$) and GnRH ($n=48$) in the presence of an ovulatory follicle ($\geq 7\text{mm}$) and randomly assigned into one of six groups: control and treated with an injection of cloprostenol sodium on day 4, 5, 6, 7, 8 post ovulation induction. Blood samples were collected to determine serum progesterone concentrations at baseline and 24 hours post injection of cloprostenol sodium. There was no effect of treatment on animals injected on day 4 for both groups. In animals treated on day 5. The results show that there was no effect of $\text{PGF}_{2\alpha}$ in animals treated on day 4 and 5 ($p > 0.05$). Animals treated on day 7 and 8 were responding with effective luteolysis at 24 hours post- $\text{PGF}_{2\alpha}$ because of their progesterone levels were $< 1\text{ng/ml}$. On day 6 is confirmed that there was luteolysis at 48 hours after $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($p < 0.05$) because of the corpus luteum had decreased in size. In conclusion, the corpus luteum which was induced to ovulation in alpacas with seminal plasma is susceptibility to luteolysis from day 6 after stimulation of ovulation.

Key words: alpacas, corpus luteum, seminal plasma, prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1.-	
Distribución de grupos experimentales.....	26
Cuadro 2.-	
Folículos al inicio del tratamiento para la inducción de ovulación.....	29
Cuadro 3.-	
Tasa de ovulación.....	30
Cuadro 4.-	
Diámetro del cuerpo lúteo (mm) post-aplicación de prostaglandina $F_{2\alpha}$ para T1 en función al tiempo de evaluación.....	31
Cuadro 5.-	
Diámetro del cuerpo lúteo (mm) post-aplicación de prostaglandina $F_{2\alpha}$ para T2 en función al tiempo de evaluación.....	33
Cuadro 6.-	
Diámetro del cuerpo lúteo (mm) en el grupo control.....	34
Cuadro 7.-	
Perfiles de progesterona (ng/ml) post-aplicación de prostaglandina $F_{2\alpha}$	35

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
 Fig. 1.-	
Diseño experimental.....	27
 Fig. 2.-	
Representación de medianas y percentiles para el diámetro del cuerpo lúteo (mm) en alpacas del T1 post-aplicación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ en los días 4, 5, 6, 8	32
 Fig. 3.-	
Representación de medianas y percentiles para el diámetro del cuerpo lúteo (mm) en alpacas del T2 post-aplicación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ en los días 4, 5, 6, 7 y 8.....	34
 Fig. 4.-	
Representación de los valores de mediana y percentiles para el monitoreo de perfiles de progesterona en T1 y T2 a las 0 horas post-aplicación de $\text{PGF}_{2\alpha}$	36
 Fig. 5.-	
Representación de los valores de mediana y percentiles para el monitoreo de perfiles de progesterona en T1 y T2 a las 24 horas post-aplicación de $\text{PGF}_{2\alpha}$	36

I. INTRODUCCIÓN

Las comunidades campesinas que habitan por encima de los 4.000 m.s.n.m. tienen como actividad principal la ganadería, siendo la crianza de camélidos sudamericanos los que más se adaptan y desarrollan en este piso ecológico. El principal problema radica en que el incremento de la población de estos camélidos, principalmente de alpacas, que constituyen la principal fuente de ingresos económicos de las familias altoandinas, es sumamente lento y sometido a riesgos que agravan el problema, como la ausencia de técnicas reproductivas (Fernández-Baca, 1991).

Los camélidos sudamericanos como la alpaca (*Vicugna pacos*), llama (*Lama glama*) y las especies silvestres como la vicuña (*Vicugna vicugna*) y el guanaco (*Lama guanicoe*) (Marín *et al.*, 2007) poseen características reproductivas propias que limitan la aplicación de ciertas biotecnologías, como la inseminación artificial, con el objetivo de mejorar la tasa de natalidad. Estudios realizados determinaron que son animales de ovulación inducida y que requieren de la cópula o de hormonas para la ovulación (San Martín *et al.*, 1968). Posteriormente, otros estudios con la ayuda de técnicas como la laparoscopia, ultrasonografía y ensayos hormonales se ha determinado que esta especie presenta ondas de crecimiento folicular, similar a otras especies. El control del desarrollo folicular, ovulación y fase luteal son de gran ayuda a la implementación y aplicación de la inseminación artificial.

El hallazgo de una proteína denominada “Factor Inductor de Ovulación” (FIO) presente en el plasma seminal de los camélidos, con capacidad de inducir ovulación

ha generado muchas interrogantes sobre el mecanismo de acción por el cual causa dicho evento. Se ha determinado que la aplicación intramuscular de plasma seminal estimula un potente efecto luteotrópico en alpacas y llamas e induce una tasa de ovulación del 100%, lo cual llevó a la formación de un cuerpo lúteo de mayor tamaño con secreción de progesterona superior en comparación con animales que fueron inducidos a ovulación con la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). Estos estudios fueron realizados midiendo las concentraciones de hormona luteinizante (LH) plasmática (Adams *et al.*, 2005, López *et al.*, 2006) y observando la vasculatura formada en el cuerpo lúteo posteriores a la ovulación, afirmando que empleando el FIO se obtiene una mayor irrigación del cuerpo lúteo asociado a su mayor tamaño (Ulloa-Leal *et al.*, 2014).

Palián (2010) obtuvo mejor tasa de concepción en animales que fueron inducidos a ovulación con plasma seminal (75%) respecto al análogo de GnRH (53.1%), con lo cual dejó evidencia que estaba asociado a un mayor tamaño del cuerpo lúteo y que en esas condiciones al liberar mayores cantidades de progesterona, mejoraría el ambiente uterino para la supervivencia del embrión. En consecuencia, estudios posteriores lograron purificar el FIO en llamas (Ratto *et al.*, 2011) y determinaron que tenía un peso molecular de 14 kDa, además se determinó que el factor de crecimiento neural- β (NGF- β) se encontraba en el plasma seminal tanto de alpaca y llamas (Kershaw-Young *et al.*, 2012; Ratto *et al.*, 2012).

Ante los beneficios que trae la aplicación intramuscular del FIO para una mejor tasa de concepción es que el presente trabajo se desarrolló con el objetivo de determinar si el cuerpo lúteo formado por la acción de la aplicación de plasma seminal es más resistente a la acción de la prostaglandina, lo cual podría explicar resultados anteriores así como determinar el día que el cuerpo lúteo es sensible a la prostaglandina exógena.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Anatomía reproductiva

Los ovarios de la alpaca son de forma globular (1.3-1.9 x 0.9-1.3 x 0.9-1.3 cm), su tamaño varía de acuerdo a las estructuras presentes en los ovarios. El peso aproximado es de 1.9 a 2.4 gramos. En las hembras nulíparas, son aplanadas lateralmente y tienen una superficie irregular debido a la presencia de muchos folículos pequeños (Sato y Montoya, 1990). En hembras adultas, numerosos folículos de 2 a 5 mm pueden ser observados en la superficie ovárica. En animales jóvenes no es fácil su detección por palpación rectal, pero por ultrasonografía son detectados una vez que alcanzan 3 mm. Los folículos preovulatorio y cuerpo lúteo pueden ser detectados por las 2 vías anteriormente mencionadas (Adams *et al.*, 1989; Vaughan *et al.*, 2006). Cada ovario está rodeado completamente por un largo pliegue del mesosálpinx con forma cónica denominado bursa ovárica, cuya porción apical forma un amplio orificio circular que comunica con la fimbria del oviducto (Bravo *et al.*, 2000).

Los oviductos son conductos delgados y tortuosos, de 15 a 20 cm de longitud, que comunican la superficie del ovario con el útero. Cada oviducto se une a un cuerno uterino a través de un estrecho orificio que forma una papila protuberante. Esta estructura, denominada istmo, actúa como un esfínter para evitar movimientos retrógrados de los fluidos contenidos en el útero (Sumar, 1996). Las funciones del oviducto son diversas, destacando la captación del ovocito proveniente del ovario, el transporte y almacenamiento de los espermatozoides depositados en el útero,

proporcionar el ambiente adecuado para que se produzca la fecundación y el inicio del desarrollo embrionario (Sato y Montoya, 1990).

El útero de la alpaca y llama es bicornes con forma de Y, se divide en cuernos, cuerpo y cérvix. Los cuernos uterinos con una longitud media de 7,5 cm y un cuerpo de 3 a 5.5 cm, en las hembras no gestantes el órgano se localiza en el interior de la pelvis (Sato y Montoya, 1990). El cuerno uterino izquierdo es más grande que el derecho desde la etapa fetal y prepuberal y esta diferencia se acentúa en las hembras multíparas como consecuencia de que el 98% de las gestaciones tienen lugar en el cuerno izquierdo (Fernández-Baca *et al.*, 1973). La mucosa uterina está formada por un epitelio cilíndrico y la submucosa por un tejido fibroso denso que contiene pequeñas glándulas uterinas (Fowler, 1998). La cérvix tiene de 2 a 3 pliegues anulares (Sato y Montoya, 1990; Smith *et al.*, 1994) y su longitud oscila entre los 2 y 5 cm. El grado de apertura o cierre está sometido a regulación endocrina, de manera que su luz se dilata durante el celo para facilitar la cópula, mientras que se estrecha durante la gestación para evitar la contaminación del útero mientras se completa el desarrollo embrionario o fetal (Sato y Montoya, 1990). La cérvix protruye en la vagina, formando dos sacos ciegos, uno dorsal y otro ventral.

La longitud de la vagina varía entre 13 - 15 cm y su diámetro está comprendido entre 3,5 - 5 cm, se caracteriza por tener una mucosa que forma numerosos pliegues (Fowler, 1998; Sumar, 1996). Es una estructura extensible, por lo que a medida que avanza la gestación, el peso del útero ocasiona la desaparición de los mencionados pliegues. El himen, o sus restos, marcan la separación entre la vagina y la vulva. La vulva constituye el límite caudal del tracto genital, el orificio externo o hendidura vulvar que tiene una dirección oblicua dorso-ventro-caudal y mide aproximadamente 2.5 cm (Sato y Montoya, 1990).

2.2. Fisiología reproductiva de la alpaca hembra

2.2.1. Pubertad

La pubertad es el proceso por el cual el animal adquiere su capacidad reproductiva. Su aparición depende de la habilidad de neuronas hipotálamicas específicas para producir GnRH en suficientes cantidades para promover y mantener la gametogénesis. La hormona responsable del inicio de la actividad ovárica es la hormona luteinizante (LH). En el estadio prepuberal de la borrega se vio que los pulsos de la LH son similares a los adultos en cuanto a su amplitud, pero mucho más bajo en su frecuencia. Como consecuencia, el crecimiento folicular es insuficiente para activar el pico preovulatorio de LH y no ocurre la ovulación (Senger, 2005; Noakes *et al.*, 2009).

La mayoría de alpacas hembras son sexualmente receptivas a los 12-14 meses de edad, a pesar que la actividad ovárica comienza a los 10 meses, con el crecimiento de folículos ováricos de 5 mm o más de diámetro, alcanzando tasas de ovulación y fecundación similares a las hembras adultas (Fernández-Baca y Novoa 1968; Novoa *et al.*, 1972). Además, una práctica generalizada de las comunidades campesinas es empezar con el empadre a la edad de 2 años en alpacas y a los 3 años en llamas (Fernández-Baca, 1993).

El inicio de la pubertad en alpacas y llamas se ve influenciada por condiciones ambientales y está fuertemente condicionado por el nivel nutricional donde se crían los animales. Por esta razón se cree que para alcanzar la pubertad necesitan alcanzar el 60% del peso corporal adulto o aproximadamente 33 kg (Sumar, 1985, citado por Brown, 2000; Smith *et al.*, 1994). Además se encontró relación entre el peso corporal en la época de empadre y la tasa de natalidad, donde se obtuvo una tasa de preñez aproximada al 50% y que por cada kilogramo de aumento de peso corporal hubo 5% de incremento en el porcentaje de natalidad; sin embargo, animales por debajo de los 33 kg los parámetros evaluados fueron independientes (Leyva y Sumar, 1981).

2.2.2. Estacionalidad reproductiva y comportamiento sexual

Existen reportes contradictorios en relación a la existencia o no de estacionalidad reproductiva de alpacas y llamas, que está asociado a las condiciones ambientales y sistemas de manejo a los que son enfrentados. En su hábitat natural, la reproducción de las cuatro especies de camélidos sudamericanos presentan un comportamiento estacional que coincide con los meses más templados y lluviosos, durante los cuales existe una mayor disponibilidad de pastos (San Martín *et al.*, 1968; Sumar, 1985, citado por Brown, 2000). Sin embargo, otras aseveraciones consideran a las alpacas y llamas como reproducción no estacional. Bravo y Sumar (1989) indican que la actividad ovárica en alpacas se produce a lo largo de todo el año y que la estación no afecta el número de folículos > 6mm observados en los ovarios.

Las comunidades campesinas que tienen machos y hembras en asociación continua todo el año se observan pariciones de diciembre a marzo, lo cual indica que el empadre se realiza entre los meses de enero y abril. Cuando se mantienen en puntas separadas el manejo del empadre se da entre enero y marzo, con lo cual la parición se da en buenas condiciones ambientales y suficiente pastura (Fernández-Baca, 1993).

La asociación continua de machos y hembras ejerce un efecto inhibitorio en la actividad sexual de los machos, incluso puede generar la desaparición completa de su libido. Sin embargo, recuperan su actividad sexual de manera inmediata cuando son introducidos a un nuevo rebaño de hembras. Por el contrario, cuando machos y hembras se mantienen separados y se los empadra en cualquier momento (por ejemplo una vez al mes), ambos son sexualmente activos todo el año y las hembras pueden parir en diferentes meses (San Martín *et al.*, 1968; Fernández-Baca *et al.*, 1972b; Sumar, 1985, citado por Brown, 2000).

La estación del año parece tener muy poca efecto en la tasas de ovulación, fertilización y supervivencia embrionaria (Fernández-Baca *et al.*, 1972a), aunque Pollard *et al.* (1995) observó que las alpacas hembras en Nueva Zelanda mostraron menor receptividad sexual y tiempo de cópula durante la primavera. No se conocen los mecanismos que regulan la estacionalidad sexual de las hembras o la inhibición

de la libido del macho como consecuencia del contacto continuo con hembras. Sin embargo, se considera que podrían intervenir algunos factores como la nutrición, la temperatura, la humedad y las horas de luz, así como estímulos visuales u olfativos, por su capacidad para influir en los centros nerviosos que controlan el comportamiento reproductivo (Brown, 2000). La estación influye también en la duración de la gestación y el peso de las crías en el momento del nacimiento. Así, un estudio realizado con alpacas en Nueva Zelanda se ha comprobado que la gestación se alarga en primavera y se acorta en otoño. Además, las crías nacidas durante el otoño pesaban 1 kg más que las nacidas en primavera (Davis *et al.*, 1997).

En los camélidos sudamericanos no se considera que tienen un ciclo estral definido, a diferencia del vacuno u oveja, porque tienen una ovulación inducida. El término usado es la presencia o ausencia de receptividad sexual. Durante la época de parición y sin la presencia de machos, pueden permanecer receptivas por periodos hasta de 36 días, con breves periodos de anestro que no son mayores de 48 horas (San Martín *et al.*, 1968). Las alpacas y llamas hembras muestran diferentes grados de receptividad sexual que es independiente al tamaño del folículo ovárico al momento de la cópula, ya que se observó el rechazo a la monta del macho a pesar de la presencia del folículo preovulatorio (Sumar *et al.*, 1993; Bravo *et al.*, 1994).

England *et al* (1971) afirman que el comportamiento sexual en las hembras receptivas se pueden dividir en fase de cortejo y fase de copulación o monta. La duración de la primera fase es influenciada por el nivel de la libido y fortaleza del macho, tiene una duración que puede llegar hasta los 10 minutos, y termina cuando el macho monta o es rechazado. La hembra no receptiva, al ser requerida por el macho, trata de escapar y se defiende pateando o escupiendo (Sumar, 1983; Novoa y Leyva, 1996). La fase de copulación suele durar entre 20 a 30 minutos, pero otros autores dan un rango más amplio desde 5 a 65 minutos (Sumar, 1985, citado por Brown, 2000; Fernández-Baca, 1993).

Una vez que la hembra acepta al macho, esta adopta una posición decúbito esternal con la pelvis elevada, lo cual facilita la monta del macho, que pone los metatarsos lateralmente a los lados de la hembra y sus patas apoyados en el piso.

Además se observa que otras hembras en celo se acercan cautelosamente a las parejas que se están apareando, huelen al macho y luego se echan al suelo permaneciendo en esa posición por todo el tiempo que dura la cópula. Algunas hembras montan a otras que están echadas, ejecutando movimientos pélvicos similares a los del macho; sin embargo, dicho estímulo no es suficiente para producir la ovulación (Fernández-Baca *et al.*, 1970; Novoa, 1970). Durante la cópula, el macho constantemente emite un sonido gutural denominado “orgling”, además de dilatación de los orificios nasales y movimientos de la cola, mientras que la hembra permanece quieta. Bravo (1994) sugiere que dicho sonido gutural puede contribuir con la respuesta neural en el hipotálamo de la hembra para la estimulación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH).

Durante la cópula el macho maniobra su pene alrededor de la vulva hasta ubicar la vagina, atraviesa la cervix, con movimientos suaves hasta llegar a uno de los cuernos uterinos, para ir posteriormente cambiando sucesivamente de un cuerno a otro a lo largo de la eyaculación (Franco *et al.*, 1981).

2.3. Endocrinología de la reproducción

2.3.1. Mecanismo neuroendocrino en el control reproductivo

La reproducción es regulado por una compleja interacción entre el sistema nervioso, endocrino y reproductor. Los mecanismos fisiológicos se realizan en el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas. Pero esta comunicación entre órganos se da gracias a sustancias mensajeras denominadas hormonas, que son liberadas desde una célula efectora hacia una célula blanco. Además, el sistema nervioso central recibe información visual, olfativa, auditiva, táctil que van a ser procesados a nivel del hipotálamo. Este órgano está formado por grupos de cuerpos neuronales, que emiten sus axones hacia la eminencia media o hacia la hipófisis. La hipófisis es una glándula que se va dividir en 2 partes: adenohipófisis y neurohipófisis. Existe un sistema portal hipotálamo hipófisis, por el cual viajan transmisores hacia la adenohipófisis. La comunicación con la neurohipófisis es directa (Senger, 2005).

La hormona liberadora de gonadotropinas o GnRH es el neuropéptido clave que controla la función reproductiva en todos los vertebrados. A diferencia de los

animales clasificados como ovuladores espontáneos cuyo mecanismo preovulatorio de GnRH se da por el estímulo de la hormona estradiol, los camélidos sudamericanos, conejos, hurones, gatos son clasificados como ovuladores inducidos cuyo estímulo para la ovulación son señales somatosensoriales genitales generadas por la introducción del pene durante la monta, lo cual implica la activación de neuronas noradrenérgicas del cerebro medio y del encéfalo. Estas neuronas noradrenérgicas proyectan un estímulo al hipotálamo basal medio y cuando se activa, promueve la liberación de GnRH desde terminales nerviosos en la eminencia media (Bakker y Baum, 2000). Se ha encontrado en muchas especies que la eminencia media contiene mayor cantidad de GnRH, y es considerada el área en la cual el péptido es almacenada en las terminaciones neuronales, previo a la liberación hacia el sistema portal.

Las células gonadotrófas presentes en la hipófisis anterior van a recibir el estímulo de la GnRH para la síntesis y liberación pulsátil hacia el torrente sanguíneo sistémico de las hormonas luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH). La FSH es importante para desarrollo y crecimiento del folículo preovulatorio. Sus receptores se encuentran en las células de la granulosa y se encarga de la conversión de la testosterona a estrógenos por el sistema aromatasa. La LH es encargada de producir la ovulación, tiene sus receptores a nivel de la teca interna que expresan enzimas necesarias para convertir el colesterol en andrógenos, pero carece de enzimas para convertir andrógenos a estradiol; sin embargo cercano a la ovulación aparecen también receptores en la granulosa. El rol principal de la secreción preovulatoria de LH es causar la ruptura folicular y la consiguiente liberación del óvulo (Senger, 2005).

Conforme el folículo dominante crece, aumenta la producción de estradiol, el cual en los rumiantes ejerce un efecto de retroalimentación positivo sobre la secreción de GnRH en el hipotálamo y a su vez incrementa el número de receptores de GnRH en la hipófisis, desencadenando el pico preovulatorio de LH. Este folículo preovulatorio empieza a luteinizarse sus células de la granulosa y teca para la conformación del cuerpo lúteo y su posterior producción de la hormona progesterona. También se ha observado que la progesterona ejerce una retroalimentación negativa a nivel del hipotálamo y desensibiliza los gonadotrófos

de la hipófisis, lo cual implica disminución de los niveles de gonatropinas circulantes (Noakes *et al.*, 2009).

La progesterona ejerce su efecto por regulación directa de la transcripción de genes a través de receptores nucleares. La exposición previa a estrógenos, que induce la producción de receptores para progesterona, es requerida para que la progesterona pueda actuar en el tracto reproductivo. Por el contrario la progesterona inhibe los receptores para estradiol y de este modo bloquea muchas de sus acciones que generalmente actúa como factores mitogénicos. En el útero, la progesterona actúa en el endometrio como un factor de diferenciación. Durante la fase folicular, los estrógenos inducen la proliferación de células en el endometrio; sin embargo, durante la fase luteal las elevadas concentraciones de progesterona inhiben la mitosis en el endometrio. También induce la diferenciación del estroma, estimula la secreción glandular en asociación con la acumulación de vacuolas basales en el epitelio glandular y cambia el patrón de proteínas secretadas por las células endometriales. Estas proteínas uterinas proporcionan un ambiente adecuado para soportar el desarrollo embrionario temprano (McCracken *et al.*, 1999).

Cuando no ocurre fertilización en rumiantes, los folículos presentes en la fase luteal empiezan a producir estrógeno, estimulando el aumento de receptores de oxitocina a nivel uterino para posteriormente estimular la secreción de prostaglandina $F_{2\alpha}$, causando la luteólisis. La retroalimentación positiva de la cascada de oxitocina desde el CL al útero y de la $PGF_{2\alpha}$ desde el útero al CL probablemente sirve como un mecanismo que asegura la luteólisis, debido a que la oxitocina luteal serviría para amplificar las señales neurales de oxitocina siendo traducidas por el útero en pulsos de $PGF_{2\alpha}$ (McCracken *et al.*, 1999).

En un estudio realizado en llamas se demostró que los receptores endometriales para estrógenos y progesterona están en mucha mayor cantidad en la fase folicular comparado con la fase luteal, sugiriendo que como otros rumiantes, los estrógenos ejercen una regulación positiva para ambos tipos de receptores, por el contrario la progesterona ejerce un efecto inverso (Bianchi *et al.*, 2007).

2.3.2. Dinámica folicular

En los camélidos sudamericanos, en ausencia de machos, ocurren ondas foliculares anovulatorias con periodos de crecimiento, maduración o estática y regresión de folículos hasta que exista un estímulo para la ovulación (Adams *et al.*, 1990; Bravo *et al.*, 1990a). Trabajos previos realizados mediante ultrasonografía demostraron que tanto las alpacas (Vaughan *et al.*, 2004), llamas (Adams *et al.*, 1990) y vicuñas (Miragaya *et al.*, 2004) presentan el patrón de crecimiento en forma de ondas foliculares similares a los rumiantes, debido a la existencia de una relación inversamente proporcional entre el folículo dominante y el número de folículos detectados.

El reclutamiento o emergencia de una cohorte o grupo de folículos permite obtener folículos antrales pequeños de 2 a 3 mm de diámetro hasta un crecimiento de 4 a 5 mm, para que luego un solo folículo llegue a ser el dominante, el cual crece para madurar y alcanzar el tamaño ovulatorio ($\geq 7\text{mm}$) y los demás regresionan (Adams *et al.*, 1989; Bravo *et al.*, 1990a). Se ha comprobado la existencia de una correlación positiva entre el tamaño del folículo dominante y las concentraciones plasmáticas de 17β -estradiol y urinarias de sulfato de estrona, tanto en alpacas (Aba *et al.*, 1995; Bravo *et al.*, 1990a), como en llamas (Aba *et al.*, 1995; Bravo *et al.*, 1990a; Chaves *et al.*, 2002). La mayor concentración de estradiol se alcanza cuando el folículo adquiere su diámetro máximo, en las alpacas a los 8 días del inicio de la oleada de crecimiento (Vaughan, 2001) y en las llamas a los 10-13 días (Chaves *et al.*, 2002).

El folículo dominante tiene tres fases de desarrollo, crecimiento (incremento de diámetro folicular), estática (cambios mínimos en el diámetro) y regresión (disminuye su diámetro) (Stevenson, 2007). Cuando el folículo dominante sufre regresión, un grupo de folículos antrales son reclutados para la emergencia de la siguiente onda folicular (Ginther *et al.*, 1989). Es probable que en camélidos al igual como sucede en otras especies, la inhibina producida por el folículo dominante participe en la regresión de los folículos subordinados (Fortune, 1994), requiriendo también del efecto sinérgico del estradiol y de otros reguladores

intraováricos, y menores niveles de FSH en el día de la desviación folicular (Ginther *et al.*, 1998).

Bravo y Sumar (1989) trabajaron con laparoscopia en alpacas y determinaron que el tiempo promedio en que se desarrolla una onda folicular es de 12 días. El periodo de crecimiento folicular fue de 4 días en promedio (3-5 días), la fase estática donde alcanza el tamaño ovulatorio (8-12 mm) dura en promedio 4 días (2-8) y la fase de regresión o atresia con un periodo de 4 días (3-5). Además en un 85% de los casos, el crecimiento folicular se alterna en ambos ovarios. Sin embargo, en otro estudio se determinó una gran variación en el intervalo entre ondas foliculares, que es el tiempo entre la emergencia folículos dominantes sucesivos, tuvo una duración entre 12 a 16 días y ocasionalmente se vio hasta los 22 días. También se determinó que la tasa de crecimiento folicular fue constante (0.43 ± 0.02 mm/día) entre los días 0 y 10 luego de la emergencia de una nueva onda folicular, por lo que la mayoría de los folículos alcanzo una medida de 6 o 7 mm de diámetro a los 6-8 días, por lo que se sugiere como el momento óptimo para el empadre (Adams *et al.*, 1989; Bravo *et al.*, 1991; Sumar *et al.*, 1993). Finalmente no encuentra alternancia de folículos en los ovarios, reportando el 60 % del folículo dominante sucesivo en el ovario ipsilateral y un 40 % en el contralateral (Vaughan *et al.*, 2004).

Bravo *et al* (1990a) utilizaron la ultrasonografía para determinar los siguientes parámetros en llamas adultas: periodo de crecimiento desde folículos 3 mm hasta 12 mm con un promedio de 4.8 ± 1.5 días, el periodo de maduración o estática con folículos de 8 mm a 12 mm en 5.0 ± 1.6 días, y la fase de regresión del folículo dominante hasta 3 mm un promedio de 4.0 ± 1.1 días. El intervalo entre ondas fue en su mayoría hasta 11.1 días, ocurriendo datos individuales de 8 y 14 días. Otro dato que se obtuvo fue que la emergencia de un nuevo folículo dominante sucesivo fue de 2 a 3 días después de la regresión en la onda folicular previa. Otro estudio determinó parámetros diferentes, pero a diferencia del trabajo previo, este se realizó bajo tres condiciones fisiológicas diferentes: anovulatoria (sin monta), ovulatoria (monta con macho vasectomizado) y ovulatoria gestante (monta con macho fértil), reportándose intervalos entre ondas de 19.8 ± 0.7 días en llamas no servidas y servidas con machos vasectomizados, y 14.8 ± 0.6 días en hembras gestantes (Adams *et al.*, 1990). Chaves *et al* (2002) encontraron que la duración de la onda

folicular en llamas es de 22.6 ± 2.5 días, con una fase de crecimiento de 9.2 ± 2.8 días, una fase estática de 5.2 ± 1.4 días y una fase de regresión con 8.2 ± 2.2 días. También se determinaron la tasa de crecimiento folicular en llamas y fue de 0.8 mm/día (Adams *et al.*, 1990) a 0.9 mm/día (Chaves *et al.*, 2002). El estado de lactación genera una disminución del desarrollo folicular debido probablemente a los niveles elevados de prolactina. En el estudio con llamas se vio claramente reducidos el intervalo entre ondas foliculares y el máximo tamaño del folículo dominante en comparación con llamas no lactantes (Adams *et al.*, 1990).

En vicuñas también se hizo un estudio de la actividad ovárica sin empadre y se obtuvo que el promedio de las ondas foliculares fue de 7.2 ± 0.5 días con un rango de 4 a 11 días. La fase de crecimiento duró 3.0 ± 0.2 días, la fase estática 1.4 ± 0.1 y la fase de regresión 2.9 ± 0.3 y el intervalo entre ondas foliculares fue de 4.2 ± 0.3 días. La tasa de crecimiento folicular fue de 1.8 ± 0.1 mm/día (Miragaya *et al.*, 2004).

El diámetro máximo alcanzado por el folículo dominante es de 7 a 12 mm en las alpacas (Bravo y Sumar, 1989; Vaughan *et al.*, 2004) y de 9 a 16 mm en llamas (Adams *et al.*, 1990). Esto podría explicar parcialmente las diferencias observadas entre ambas especies en la duración del intervalo entre dos oleadas consecutivas. No obstante, no explica el corto intervalo entre oleadas observado en las vicuñas (Miragaya *et al.*, 2004), en las cuales el diámetro máximo del folículo dominante, 6 a 11 mm, es muy similar al de las alpacas.

2.3.3. Ovulación

Este mecanismo endocrino se refiere a la ruptura o luteinización del folículo dominante y la salida del ovocito para que sea fecundado. En los rumiantes se debe al pico preovulatorio de LH formado por una retroalimentación positiva por parte del estradiol (E_2) a nivel del hipotálamo, que estimula a su vez una mayor liberación de la GnRH hacia la hipófisis, con lo cual genera mayor liberación de gonadotropinas. Antes de la ovulación la membrana basal del folículo dominante empieza a desintegrarse, por lo cual hay una separación física de la teca y granulosa. Finalmente estas células se reorganizan de tal manera que van a formar las células luteales pequeñas y las células luteales grandes respectivamente

formando el cuerpo lúteo, encargado de la secreción de progesterona (Senger, 2005).

Debido a que los camélidos sudamericanos son clasificados como ovuladores inducidos, las hembras requieren de un estímulo físico como la cópula (San Martín *et al.*, 1968) o la administración de hormonas con actividad semejante a la LH para la ovulación. Se evaluó el efecto de diferentes estímulos de monta para la inducción de ovulación en alpacas encontrando que la tasa de ovulación fue baja en las hembras que fueron montadas por otras hembras o aquellas montadas sin copulación y no hubo diferencia significativa de aquellas hembras que no recibieron ningún estímulo. Las hembras que fueron empadradas por un macho entero o vasectomizado ovularon en un 77-82%, indicando que la monta y la introducción del pene son necesarias para brindar una adecuada estimulación para la ovulación. (Fernández-Baca *et al.*, 1970).

En alpacas y llamas se determinó que el folículo dominante ≥ 7 mm es el tamaño mínimo para que ocurra ovulación. Cuando se vio folículos pequeños (4 a 6 mm) hubo un incremento ligero en los niveles plasmáticos de LH (29.1 ng/ml/h) luego de la cópula, pero no ovularon. Los folículos en fase de crecimiento, estática y regresión (7 - 12 mm) tuvieron una mejor descarga de LH (62.4, 55.1, 63,7 ng/ml/h respectivamente). Además se determinó que las llamas tengan mayor liberación de LH post-cópula comparado con la alpaca. Por el contrario, las concentraciones de FSH no fue afectado por la cópula que tuvo un promedio de 0.96 ng/ml en niveles plasmáticos. Otro dato de este experimento fue que los folículos que estaban en regresión llegaron a luteinizarse, mas no ovular. Esta estructura luteal formada tuvo una vida media de 5 días, por lo tanto hubo un retraso del inicio de un nuevo folículo dominante de 5 a 7 días (Bravo *et al.*, 1991).

La elevación de los niveles de estradiol asociada al crecimiento folicular no es suficiente, como en los rumiantes, para provocar la descarga preovulatoria de LH. En camélidos sudamericanos, es la estimulación producida por el coito la que inicia el proceso de descarga de LH. Es así que las concentraciones de estradiol no varían durante las 18 horas posteriores a la cópula, tienden a declinar a las 22 horas y son

significativamente menores alrededor de las 48 horas después de la cópula (Bravo *et al.*, 1990b).

El intervalo entre la cópula y la ovulación es aproximadamente de 30 h (rango de 24 a 48 h) en la alpaca y la llama (Adams y Ratto, 2001; Huanca *et al.*, 2001; San Martín *et al.*, 1968). Adams *et al.*, (1990) observaron que el intervalo entre la cópula y la ovulación es bastante constante en las llamas, de tal forma que el 96% de los animales ovularon en el transcurso del segundo día posterior al coito y solamente un 4% lo hizo en el tercer día. No se ha observado ninguna influencia del tamaño del folículo dominante en el intervalo cópula-ovulación (Adams *et al.*, 1990; Sumar *et al.*, 1993). Sin embargo, se ha comprobado que la velocidad de crecimiento del folículo dominante desde la monta hasta la ovulación depende del tamaño del mismo. Cuando su diámetro estaba comprendido entre 7 y 9 mm su crecimiento fue de 0,6 a 1 mm/día, mientras que los folículos con un diámetro entre 10 y 12 mm solamente crecían 0,2 mm/día (Adams *et al.*, 1990).

Fernández-Baca *et al.*, (1970) indicaron que hay una respuesta variable en la relación entre el tiempo de duración de la cópula y la ovulación, ya que animales con 5 minutos de estímulo llegaron a ovular a diferencia de aquellos animales con más de 20 minutos fallaron en la ovulación.

En llamas se hizo un estudio para ver los niveles plasmáticos de LH luego de la monta natural y los resultados mostraron que empieza a incrementarse a los 15 minutos del estímulo, teniendo un pico a las 2 horas, y vuelve a sus niveles basales a las 7 horas post-monta (Bravo *et al.*, 1990b). Se pensaba que algunas alpacas y llamas que no llegaban a ovular luego de un empadre se podrían mejorar si hay un segundo estímulo para incrementar los niveles de LH. Por lo tanto, aplicaron un segundo estímulo (cópula y GnRH) a las 6 y 24 horas del primer estímulo en alpacas y llamas, encontrando que no hubo aumento en la liberación de LH (Bravo *et al.*, 1992). Se sugiere que el eje hipotálamo-hipofisario podría manifestar un periodo refractario, que posiblemente sería consecuencia de la depleción de LH hipofisaria o de una disminución en el número de receptores hipofisarios para la GnRH.

Durante los primeros días posteriores a la ovulación, las hembras pueden mostrar celo debido probablemente a que los niveles de progesterona secretados no son suficientes para ejercer un efecto inhibitorio en el eje hipotálamo - hipofisiario (Leyva y García, 1999a). Posteriormente, el día 5 post ovulación la presencia de un cuerpo lúteo funcional que secreta niveles adecuados de progesterona inhibe el comportamiento de celo (Fernández-Baca, 1971) y será el principal soporte de la preñez (Bravo, 2002).

Se han reportado ovulaciones espontáneas de 5%, siendo más frecuentes durante el postparto. No se conoce el mecanismo por el cual se producen, pero se mencionan como los estímulos físicos, auditivos, olfatorios o visuales causantes de dicho fenómeno (Fernández-Baca *et al.*, 1970; Bravo *et al.*, 1989).

2.3.4. Factor Inductor de Ovulación (FIO)

El plasma seminal es una secreción producida por los testículos y las glándulas accesorias, en el caso de la alpaca poseen próstata y bulbouretrales. Esta secreción se creía que solo era un simple vehículo de los espermatozoides. Sin embargo, se afirma que las proteínas, factores de crecimiento, hormonas y citocinas presentes en el plasma seminal pueden regular funciones importantes en los espermatozoides y en el sistema reproductor femenino (Juyena *et al.*, 2012).

En china se realizó un estudio con camellos bactrianos en donde evidenciaron ovulación inducida en un 87% por el depósito de semen en la vagina en ausencia del macho, por lo tanto concluyeron que existe un factor desconocido en el semen de los camellos bactrianos responsable de la ovulación y que no era necesario un estímulo mecánico como la monta (Chen *et al.*, 1985). Rios (1989) inseminó intravaginalmente, depositando 2 ml de semen de toro, 2 ml de semen de alpaca y 2 ml de plasma, induciendo la ovulación en un 53%, 66.7% y 7.6% respectivamente. También se encontró una tasa ovulatoria de 7.6% con plasma seminal de machos vasectomizados que sugirió la existencia de un factor inductor de la ovulación en el semen de alpaca y toro mas no en el plasma seminal de machos vasectomizados, pero si probablemente en el plasma seminal de machos enteros. Además no se produjo ninguna ovulación cuando deposito dentro de la vagina 2 ml de GnRH,

pero si se produjo ovulación en casi todos cuando se inyectó 2 ml de hCG (1000UI) o GnRH (0.008mg).

Paolicchi *et al* (1999) utilizaron el plasma seminal de alpaca para ver su efecto *in vitro* en células de la pituitaria de ratones y sugieren que algunos factores en el plasma seminal contribuyen a la liberación de LH. Además mencionaron que dicho factor es una molécula diferente a la GnRH, porque al agregar anticuerpos anti-GnRH no modificó la secreción de LH. Bogle *et al* (2012) llegaron a similares conclusiones debido a que trabajaron con células de pituitaria de llama *in vitro* y afirmaron que el FIO ejerce un efecto directo en las gonadotrofas de la pituitaria. Sin embargo, otro trabajo *in vivo* en llamas buscó determinar si el efecto del FIO en la secreción de LH es mediada por la estimulación del hipotálamo o la hipófisis utilizando un antagonista de la GnRH (acetato de cetrorelix), resultando en una inhibición del pico preovulatorio de LH. Por lo tanto se afirma que la acción del FIO es modulada de una manera directa o indirecta en las neuronas de la GnRH en el hipotálamo (Silva *et al.*, 2011).

El plasma seminal tiene una actividad biológica luteotrópica potente porque provoca una secreción plasmática de LH significativamente mayor comparado con animales inducidos a ovulación con GnRH (> 8h y 5.5h respectivamente), formando un cuerpo lúteo de mayor tamaño y duplicando la secreción de progesterona (Adams *et al.*, 2005). Estos resultados concuerdan con Palian (2010) donde muestra el tamaño del cuerpo lúteo en el día 8 post-tratamiento, encontrando diferencias estadísticas entre los tratados con plasma seminal y GnRH ($15.2 \pm 1.1\text{mm}$ y $12.6 \pm 2.1\text{mm}$ respectivamente). Estos resultados sustentan porque se obtuvo mayor tasa de concepción en animales tratados con plasma seminal en comparación con GnRH, ya que una mayor secreción de progesterona podría contribuir a mejorar el ambiente uterino del embrión.

Ratto *et al* (2005) y Panez *et al* (2009) evaluaron si el FIO ejerce su efecto vía local o sistémica y si el sangrado a nivel uterino mejora la respuesta ovulatoria. Los resultados obtenidos fueron que su acción es vía sistémica, ya que se aplicó 2 ml de plasma seminal a nivel intramuscular y se comparó cuando se administra vía intrauterina, obteniendo tasas de ovulación de 93% y 41% respectivamente.

Además se realizó un curataje por 3 minutos de la mucosa uterina para simular el estímulo físico del macho al momento del empadre y se administró plasma seminal a nivel uterino, obteniendo tasas de ovulación superiores (67%) en comparación con la ausencia de curataje. Se entiende que la copulación por ser un estímulo físico lleva a un edema, hiperemia e inflamación del endometrio, con lo cual facilita la absorción del FIO (Bravo *et al.*, 1996).

Estudios realizados por Ratto *et al* (2010) determinaron que el FIO presente en el plasma seminal de llamas, tenía un componente proteico con una masa molecular de ≥ 30 kDa, con una gran capacidad de resistencia a la acción térmica y a la digestión enzimática con proteinasa K, además mencionaron que no era ni un esteroide, prostaglandina ni molécula similar a la GnRH. Una posterior investigación utilizó cromatografía líquida para aislar y purificar las fracciones proteicas del plasma seminal de llamas, responsable del efecto ovulatorio en el eyaculado. Se encontró que el FIO es una molécula proteica de 14 kDa que provoca el pico preovulatorio de LH seguido de ovulación y formación del cuerpo lúteo en llamas (Ratto *et al.*, 2011).

Se realizó un estudio para determinar si la dosis del FIO purificado del plasma seminal de llama requerida para provocar una respuesta ovulatoria es fisiológicamente relevante en términos de la proporción presente en el eyaculado normal. Las llamas hembras fueron inyectadas intramuscularmente con dosis de 500 μ g, 250 μ g, 125 μ g o 60 μ g de FIO purificado (representativo de 1/25 a 1/200 de la cantidad presente del eyaculado normal) y se observó una alta incidencia de ovulación, cuerpos lúteos de mayor tamaño y altas concentraciones de progesterona en los animales tratados con dosis de 500 μ g. La mínima dosis efectiva usada en el estudio fue de 125 μ g de OIF purificado, equivalente a 1/100 de un eyaculado normal (Tanco *et al.*, 2011).

El factor inductor de ovulación presente en el plasma seminal de los mamíferos se encuentra en diferentes concentraciones. Es por eso que estudios previos determinaron que en los toros (Ratto *et al.*, 2006), caballos y cerdos (Bogle *et al.*, 2011) y conejos (Silva *et al.*, 2011) inducen ovulación en 26%, 29%, 18% y 100% respectivamente, en llamas utilizadas en bioensayos. Por lo que se afirma que la

concentración del FIO en animales de ovulación inducida, como los camélidos y conejos, es mucho mayor o ejerce una mayor potencia en comparación con animales de ovulación espontánea.

Kershaw-Young *et al* (2012) y Ratto *et al* (2012) trabajaron en alpacas y llamas, respectivamente y lograron identificar al factor inductor de ovulación como una proteína de 13.2 KDa con 12-23 aminoácidos, lo cual es compatible con la neurotrofina conocida como Factor de Crecimiento Neural β (β -NGF). Este factor es la proteína más abundante en el plasma seminal de alpacas. El contenido proteico total en el plasma seminal de alpacas es de 40 mg/mL (Garnica *et al.*, 1993). En llamas cada eyaculado contiene aproximadamente 12 mg de FIO (Tanco *et al.*, 2011), por lo cual el NGF- β contribuye al 15-30% de la proteína total en el plasma de camélidos sudamericanos.

El efecto del OIF parece no actuar solo, ya que un ensayo realizado en llamas que se les practicó ovariectomía para ver el efecto en la secreción de la LH y determinar el efecto del OIF pre-tratadas con 17β -estradiol o benzoato de estradiol. Los resultados obtenidos fueron que las concentraciones de estradiol en llamas modulan parcialmente el efecto del OIF en la secreción de LH por la pituitaria; sin embargo, otros factores ováricos podrían también participar en esta modulación del OIF (Silva *et al.*, 2012).

2.3.5. Cuerpo lúteo

Es una glándula endocrina transitoria que se forma a partir del folículo ovulatorio. El cuerpo lúteo maduro está conformado por estos 2 tipos de células esteroideogénicas. Las células luteales pequeñas provienen de las células de la teca y responden a la LH con incremento en la secreción de progesterona, cuyo mecanismo es activando la protein quinasa A via segundo mensajero. Las células luteales grandes son de origen de la granulosa y contiene los receptores para la $PGF_{2\alpha}$. Si la preñez no ocurre, el cuerpo lúteo empieza a regresionar y permite el crecimiento folicular para dar paso a una nueva onda folicular (Niswender *et al.*, 2000). Adicionalmente el cuerpo lúteo contiene células endoteliales, fibroblastos, pericitos y otras células derivadas del flujo sanguíneo. La proliferación celular en el desarrollo del cuerpo lúteo tiene un índice mitótico igual al del crecimiento de

tumores. El principal regulador de la proliferación de células endoteliales es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). La LH o hCG induce su expresión por el folículo preovulatorio y células de la granulosa. La proliferación de las células endoteliales es requisito para la neovascularización durante la fase luteal, lo que genera altas demandas metabólicas hacia el ovario (McCracken *et al.*, 1999).

En condiciones normales la mayoría del colesterol es sintetizado en el hígado y transportado para los tejidos esteroidogénicos como la corteza adrenal, folículos, cuerpo lúteo y testículos en forma de lipoproteínas. Las mayores fuentes de colesterol son las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y las de alta densidad (HDL). Una vez libre el colesterol en el citosol de la célula puede tomar 3 vías: usado para la esteroidogénesis, formación de membranas celulares o ser almacenadas en forma de ésteres de colesterol por la enzima colesterol ester-sintetasa. Todos estos mecanismos son controlados por la protein-quinasa A vía segundo mensajero. La síntesis de todos los esteroides depende del transporte del colesterol hacia la mitocondria, por la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR), y en su membrana interna por mecanismos enzimáticos transforman el colesterol en pregnenolona, por la enzima citocromo P-450 escisión de la cadena lateral (P-450_{scc}). Finalmente la pregnenolona es transportada al retículo endoplásmico liso donde la enzima 3 β -HSD convierte la pregnenolona a progesterona (McCracken *et al.*, 1999; Niswender *et al.*, 2000).

El cuerpo lúteo se desarrolla en el ovario a los 3-5 días de la cópula o aplicación hCG (2 a 4 días después de la ovulación), observándose una elevación de los niveles de progesterona entre 4 y 6 días después del coito (Adams *et al.*, 1990; Sumar y Bravo, 1991; Aba *et al.*, 1995). Se reporta que el tamaño máximo alcanzado por el cuerpo lúteo varía entre los 10 a 15 mm en alpacas y llamas, y llegan a ese tamaño entre los días 7 y 9 post-cópula, coincidiendo con los niveles máximos de progesterona (Adams *et al.*, 1991; Aba *et al.*, 1995). Si no hay gestación la vida media del cuerpo lúteo es de 8 a 9 días, iniciando su regresión, reduciéndose su diámetro a la mitad a los 12 días del coito, al mismo tiempo que desciende la secreción de progesterona, alcanzando su nivel más bajo en los días 14 ó 15 (Fernández-Baca *et al.*, 1970; Adams *et al.*, 1989, 1990; Sumar y Bravo,

1991). Las hembras vuelven a mostrar receptividad sexual 12 a 14 días después de la última cópula.

La existencia de un cuerpo lúteo funcional no interrumpe las oleadas de crecimiento folicular, de manera que a los pocos días de la ovulación se forma un nuevo folículo dominante. Sin embargo, la presencia de progesterona reduce el crecimiento folicular, de tal manera que el número de folículos que inician el crecimiento y el diámetro alcanzado por el folículo dominante son más reducidos. Además el intervalo entre oleadas no sufre ninguna modificación (Adams *et al.*, 1990).

Para evaluar la actividad secretoria del cuerpo lúteo en camélidos se realizan análisis de progesterona plasmática y glucorónido de pregnandiol en orina. Una disminución de la progesterona plasmática se observó 1-3 días antes de la reducción morfológica en el diámetro del cuerpo lúteo. Los niveles circulantes de progesterona mayor a 2 ng/ml (6,4 nmol/L) se consideran una fuerte indicación de la presencia de un cuerpo lúteo maduro funcional (Adams *et al.*, 1991). Sin embargo, Sumar *et al* (1988) definieron el lapso de tiempo de la fase lútea cuando la progesterona en plasma fue mayor que 1 nmol/l (0,32 ng/ml).

En alpacas y llamas han sido descritas fases luteales cortas. Sumar *et al* (1988) reportaron fases luteales de solo 4 días en 2 hembras de un grupo de 12 tratadas. Por estudios de ecografía mostraron que folículos en fase de regresión (7-10 mm de diámetro) hubo una falla en la ovulación a pesar de la liberación normal de LH en respuesta a la cópula. Estos folículos desarrollan tejido luteal con una cavidad central y tuvo una vida media de aproximadamente 5 días (Bravo *et al.*, 1991). Se postuló que las células de la granulosa en los folículos en regresión pueden tener la capacidad para la luteinización, pero han perdido la capacidad de secretar factores importantes para la ruptura del folículo.

Estudios en ovejas dejaron evidencia que la hipófisis es importante para el normal funcionamiento del cuerpo lúteo. La hipófisis fue removida en el día 5 del ciclo estrual, por lo que el cuerpo lúteo no incremento de peso y las concentraciones de progesterona permanecieron con niveles bajos. Cuando se comparó con el grupo control, se vio que dicha pérdida de peso fue resultado de la

disminución en el número de células luteales pequeñas, fibroblastos y disminución en el tamaño de ambas células luteales (Farin *et al.*, 1990). Otro experimento explicó que tanto las LH y GH en ovinos con remoción de la hipófisis son necesarios para el desarrollo y función normal del cuerpo lúteo (Juengel *et al.*, 1995).

2.3.6. Luteólisis

Se define al evento fisiológico por el cual desaparece el cuerpo lúteo, donde ocurre 2 eventos casi simultáneamente y son: la disminución en la producción de progesterona, considerado una luteólisis funcional, y la involución del cuerpo lúteo, considerado una luteólisis estructural. Esta disminución en la producción de progesterona se debe a la disminución del flujo sanguíneo y disminución de la capacidad esteroidogénicas de las células luteales (Niswender *et al.*, 2000).

El cuerpo lúteo tiene una fuente rica de ácido araquidónico (AA), un ácido graso esencial almacenado en los fosfolípidos de la membrana y es el precursor primario de todas las prostaglandinas. La producción neta de prostaglandina es controlado por muchas enzimas como son las fosfolipasas citosólicas A2 (cPLA2), ciclooxigenasas (COX), sintasa de PG, 15-PG deshidrogenasa (PGDH). La cPLA2 libera el ácido araquidónico de los fosfolípidos de la membrana celular. La COX-1 y COX-2 convierte el AA en PGH₂, el metabolito intermedio común para varias formas de PG, incluidas PGE₂ y PGF₂α. La PGE sintasa (PGES) y la PGF sintasa (PGFS) catalizan la conversión de la PGH₂ hacia PGE₂ y PGF₂α respectivamente. El catabolismo de las prostaglandinas es gobernado por la PGDH convirtiendo la PGE₂ y PGF₂α en metabolitos inactivos como PGEM y PGFM (Arosh *et al.*, 2004).

La prostaglandina F₂α (PGF₂α) es el principal agente luteolítico en los rumiantes causante de la regresión del cuerpo lúteo. Esta hormona es secretada de una manera pulsátil en alpacas no preñadas desde el endometrio hacia la circulación sistémica a través de las venas uterinas (Aba *et al.*, 2000). Además se observó un hecho peculiar en los camélidos, en la cual la actividad luteolítica en el cuerno uterino derecho es local y afecta solamente al cuerpo lúteo ipsilateral, mientras que el cuerno uterino izquierdo tiene un efecto local y sistémico, afectado el cuerpo lúteo

de ambos ovarios (Fernández-Baca *et al.*, 1979). Esta diferencia en la actividad luteolítica puede explicarse por una diferencia en la anatomía vascular del útero, ovarios y oviductos, donde se observó que en el 90% de las hembras la arteria uterina derecha es más gruesa y presenta ramificaciones que irrigan el cuerno izquierdo, mientras que la vena uterina izquierda presenta un diámetro superior. Ello ha llevado a sospechar de la existencia de conexiones arterio-venosas que permiten al cuerno izquierdo influir sobre la actividad funcional del ovario derecho (Del Campo *et al.*, 1996).

La liberación de prostaglandina en los rumiantes se debe a que la progesterona deja ejercer su efecto inhibitorio al estradiol, este va estimular a los receptores de oxitocina a nivel del endometrio. La hipófisis posterior y el cuerpo lúteo empiezan a secretar oxitocina, que al llegar al endometrio emiten señales por segundos mensajeros para la producción de prostaglandina $F_{2\alpha}$. Experimentos hechos en vacunos, ovejas, cerdas, ratas llegaron a la conclusión que esta hormona también es producida directamente por las células luteales cuando adquieren una capacidad luteolítica y es importante para una completa luteólisis (Díaz *et al.*, 2002; McCracken *et al.*, 1999).

La $PGF_{2\alpha}$ sérica induce el aumento del flujo sanguíneo a nivel de arteriolas periféricas del cuerpo lúteo maduro, a través de la producción de óxido nítrico. Ese aumento en el flujo sanguíneo es inmediatamente anterior a la disminución de las concentraciones séricas de progesterona. El aumento en el flujo sanguíneo induce la expresión de Endotelina-1 (ET-1) y Angiotensina II potentes vasoconstrictores. Esto aparentemente induce la disminución de la producción de progesterona (Kobayachi *et al.*, 2001).

La disminución transitoria de progesterona sugiere la acción de la prostaglandina $F_{2\alpha}$ sobre el cuerpo lúteo (Fernández-Baca, 1993). La $PGF_{2\alpha}$, secretada por el endometrio, puede ser el agente luteolítico en camélidos sudamericanos, debido a que se demostró que la prostaglandina exógena ocasiona luteólisis, solo cuando se administra después del cuarto día de la fase luteal inducida. En hembras no preñadas la caída de progesterona coincide con un incremento en los niveles de

prostaglandina entre los días 9 y 12 post-cópula lo que no sucede en hembras preñadas (Leyva y García, 1999b).

En camélidos se han estudiado los cambios en las concentraciones plasmáticas del principal metabolito de la prostaglandina (PGFM 3,14 dihidro-15-ceto- $\text{PGF}_{2\alpha}$ o 15-ceto-dihidro- $\text{PGF}_{2\alpha}$) (Aba *et al.*, 2000). Los niveles basales de PGFM son de 200 pmol/L hasta la fase luteal temprana. Luego hay un ligero incremento 7 días después de la monta en llamas y la progesterona empieza a disminuir en el día 8. Desde el día 8 ó 9 hasta el día 12 ó 13 post monta, se encontraron pulsos repetidos de PGFM hasta alcanzar un pico promedio de 800 - 1200 pmol/L en llamas y 600 pmol/L en alpacas (Aba *et al.*, 1995, Sumar *et al.*, 1988). En llamas el 35% de $\text{PGF}_{2\alpha}$ liberada ocurre entre los días 8 y 9 y el 65% entre los días 10 y 12 cuando la progesterona disminuye menor a 1nmol/L (Aba *et al.*, 2000).

El mecanismo por el cual al inicio de la fase luteal en los rumiantes el cuerpo lúteo no responde a la $\text{PGF}_{2\alpha}$ hasta el momento no se conoce. Sin embargo, un ensayo determinó que los receptores de alta afinidad están presentes en los días 2, 4, 6 post-ovulación en concentraciones similares, por lo que no habría motivo para un periodo refractario del cuerpo lúteo (Wiltbank *et al.*, 1995). Se propuso que la alta actividad de la PGDH podría ser el responsable de la baja concentración intraluteal de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Tsai *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2000). Por el contrario, Arosh *et al* (2004) mostraron que las proteínas PGDH está presente durante todo el ciclo estral de bovinos en niveles bajos. Afirman que la expresión de transportadores de prostaglandina es baja y que la biosíntesis de PGE_2 y las vías de señalización son altas durante el crecimiento del cuerpo lúteo. Por lo tanto, esta limitada disponibilidad de transportadores de PG y un incremento de la producción de PGE_2 podrían explicar el periodo refractario del cuerpo lúteo en crecimiento para la luteólisis en respuesta a la $\text{PGF}_{2\alpha}$ extraluteal.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de estudio

El presente trabajo se realizó durante los meses de enero a marzo del 2013 en el Centro de Investigación y Producción (CIP) Quimsachata, anexo de la Estación Experimental ILLPA, Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) - Puno, Perú. El centro está ubicado en la provincia de Lampa, distrito de Santa Lucía, a 4,200 m.s.n.m., 15°45' de latitud sur y 70°34' de longitud oeste, que corresponden a la zona agroecológica Puna Seca, cuyo clima es de tipo semi-seco frío, siendo la temperatura media de 7°C (máxima 18°C y mínima -13°C). La precipitación pluvial oscila entre 400 y 688 mm/año, siendo los meses más húmedos los comprendidos entre diciembre y marzo.

3.2. Animales

Se utilizaron 96 alpacas hembras adultas huacayas escogidas al azar en un grupo de 300 animales, entre 6 y 7 años, con antecedentes de partos previos, sin cria al pie y sin problemas reproductivos aparentes. Todos los animales eran mantenidos en corrales con otras alpacas y llamas hembras, sin la presencia de macho. Su alimentación era bajo pastoreo extensivo con pasturas naturales.

3.3. Obtención del plasma seminal

El plasma seminal se colectó semanas previas al experimento de 8 alpacas machos adultos (4-7 años) entrenados para la colección de semen mediante vagina artificial, la cual se cubrió con una frazadilla eléctrica para mantener una temperatura de 38 °C, adaptada a un maniquí de alpaca. Las muestras de semen fueron procesadas de acuerdo al procedimiento descrito previamente por Adams *et al.*, 2005. Cada eyaculado fue diluido 1:1 (v/v) con fosfato buffer salino (PBS, Gibco, Grand Island, NY) y luego centrifugado a 1500 g por 30 minutos. Luego el sobrenadante fue decantado y se evaluó una gota al microscopio para corroborar la ausencia de espermatozoides. Posteriormente se almacenaron en tubos falcon de 10 ml, se adicionó Sulfato de Gentamicina a razón de 10 mg por cada 10 ml de solución, y finalmente fue conservado a -20°C hasta su posterior uso.

3.4. Diseño experimental

3.4.1. Evaluación ecográfica pre-experimental

La selección de las 96 alpacas se basó en la detección de un folículo dominante ≥ 7 mm de diámetro, detectado mediante ultrasonografía. Se utilizó un ecógrafo ALOKA SSD 500 con un de transductor lineal 5 MHz.

3.4.2. Aplicación del inductor de ovulación

Se seleccionó al azar 48 animales a los que se indujo a ovulación con 1 ml de plasma seminal (T1) y 48 animales con 1 ml (0.0042 mg) de un análogo de la GnRH (Acetato de buserelina) (Conceptal, Intervet International GmbH, Alemania) (T2), ambos por vía intramuscular.

Cuadro 1. Distribución de grupos experimentales

Grupo	Tratamiento	Número de animales
T1	Plasma seminal	48
T2	GnRH	48

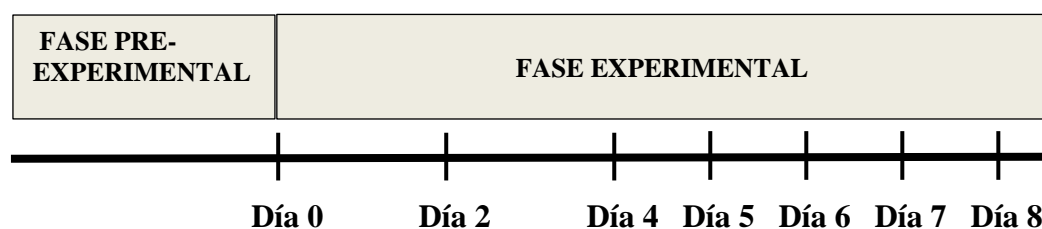
3.4.3. Evaluación ecográfica para determinar ovulación

Se realizaron evaluaciones ecográficas a las 48 horas para determinar la tasa de ovulación en base al criterio de desaparición del folículo dominante detectado previamente. Los animales que no llegaron a ovular fueron retirados del experimento.

3.4.4. Aplicación de tratamientos

Los animales que ovularon fueron distribuidos al azar en 6 grupos de tratamientos, en los cuales se les administró 1 ml (0.262 mg) de un análogo de la prostaglandina $F_{2\alpha}$ (Cloprostenol sódico) (Lutaprost, Agrovemarket, Perú) en los días 4, 5, 6, 7, 8 post inducción de ovulación y un grupo control que no se administró tratamiento.

Figura 1. Diseño experimental



Día 0: Aplicación del inductor de ovulación (GnRH y plasma seminal).

Día 2: Ecografía para determinar ovulación.

Día 4:
Día 5:
Día 6:
Día 7:
Día 8:

Aplicación de $PGF_{2\alpha}$

Las evaluaciones ecográficas se realizaron para medir el diámetro del cuerpo lúteo a las 0, 24 y 48 horas posteriores a la aplicación del análogo de prostaglandina, para observar posible luteólisis. En el grupo control se tomaron

medidas del cuerpo lúteo los días 4, 7, 8, 10, 11, 12, 14 para ver la dinámica de crecimiento del cuerpo lúteo tanto para plasma seminal como para GnRH.

3.4.5. Toma de muestra

Las muestras de sangre se obtuvieron de la vena yugular de las alpacas, luego se centrifugó a 1700 g por 25 minutos, se decantó el suero para almacenarlos en viales de 2 ml y se congelaron a -20°C hasta su uso. En los grupos tratados, las muestras sanguíneas fueron tomadas a las 0 y 24 horas posteriores al tratamiento con prostaglandina. Para determinar los perfiles de progesterona se utilizó el kit comercial de radioinmunoensayo (PROG-RIA-CT, KIP1458, Bélgica. Se considera que existe una luteólisis efectiva cuando los valores de progesterona disminuyen por debajo a 1ng/ml.

3.5. Análisis estadístico

Los datos evaluados en el experimento fueron analizados con el programa estadístico STATA 12.0 (Stata Corp). Los valores de distribución para el diámetro de folículos iniciales en cada uno de los tratamientos así como la distribución del diámetro de cuerpos lúteos para cada tratamiento y tiempo de evaluación fueron analizados mediante la prueba de Shapiro Wilk y Kolmogorov – Smirnov (Bajo una H_0 : Normalidad). La relación entre la tasa de ovulación con los grupos en estudio fueron evaluadas con la prueba de Chi-Cuadrado. La susceptibilidad del cuerpo lúteo, en función al diámetro, mediante la aplicación de prostaglandina en alpacas inducidas a ovulación mediante plasma seminal, así como mediante GnRH para cada uno de los tiempos de evaluación (0, 24 y 48 horas post-prostaglandina) fueron analizadas mediante la prueba paramétrica de Análisis de Varianza (ANOVA) y diferencias múltiples de Bonferroni. Los resultados sobre los perfiles de progesterona a las 0 y 24 horas post-aplicación de prostaglandina fueron analizados con la prueba de Kruskal-Wallis. Todos los análisis fueron realizados con un nivel de confianza de 95%.

IV. RESULTADOS

4.1. Evaluación inicial de folículos

El cuadro 2 indica los resultados del análisis descriptivo para el diámetro de folículos al inicio del experimento. Como se puede apreciar, los valores promedio de diámetro de folículos en las alpacas que fueron distribuidos para cada uno de los tratamientos de ovulación son similares (9.42 mm para T1 y 9.23 mm para T2), además de presentar valores similares de desviación estándar. Los resultados del ANOVA no demostraron diferencias estadísticas significativas para los valores promedio obtenidos ($p > 0.05$).

Cuadro 2: Folículos al inicio del tratamiento para la inducción de ovulación.

Valores estadísticos descriptivos	T1 ^a	T2 ^a	TOTAL
N	48	48	96
Diámetro promedio (mm) \pm D.E.	9.42 \pm 1.33	9.23 \pm 1.29	9.32 \pm 1.31

T1: Aplicación de plasma seminal; T2: Aplicación de GnRH

Letras diferentes en tratamientos indican diferencia estadísticas significativas

ANOVA: 0.49; $p > 0.49$

4.2. Tasa de ovulación

Los resultados de tasa de ovulación post-tratamiento son presentados en el cuadro 3. Bajo la aplicación de plasma seminal se presentó una tasa de 97.92% (47/48), mientras que bajo la aplicación de GnRH se presentó una tasa de 93.75% (45/48); resultando estos valores no significativos ($p>0.05$).

Cuadro 3: Tasa de ovulación.

Tratamiento	Numero de alpacas	Tasa de ovulación
T1 ^a	48	97.92% (47/48)
T2 ^a	48	93.75% (45/48)
TOTAL	96	95.83% (92/96)

^a Los resultados no fueron estadísticamente diferentes ($p>0.05$)

T1: Plasma seminal

T2: GnRH

4.3. Evaluación de la susceptibilidad del cuerpo lúteo post-aplicación de prostaglandina

4.3.1. Alpacas inducidas a ovulación con plasma seminal plasma

Los resultados estadísticos descriptivos de susceptibilidad del cuerpo lúteo post-aplicación de prostaglandina son presentados en los cuadros 4 y 5. En relación al T1 a las 0 horas, los valores promedio más altos de diámetro del cuerpo lúteo fueron obtenidos en alpacas que recibieron $\text{PGF}_{2\alpha}$ a los días 7 (12.50 mm) y 8 (12.00 mm) respectivamente.

La evaluación de susceptibilidad del cuerpo lúteo a las 24 horas post-aplicación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ indicó los valores promedio más altos de diámetros en alpacas que recibieron $\text{PGF}_{2\alpha}$ al día 4 (10.87 mm), mientras que los menores valores de diámetro fueron observados en alpacas que recibieron $\text{PGF}_{2\alpha}$ a los días 6 (9.50 mm) y 7 (9.50 mm), indicándose además que estos valores fueron inferiores a los valores de diámetro promedio el día anterior. Sin embargo, el análisis de varianza no demostró diferencias estadísticas significativas entre los períodos de aplicación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($p>0.05$).

A las 48 horas post-aplicación de $\text{PGF}_{2\alpha}$, se pudo observar una disminución en los valores de diámetro promedio del cuerpo lúteo en alpacas a las cuales se les aplicó $\text{PGF}_{2\alpha}$ a los días 6, 7 y 8 (7.88 mm, 8.00 mm y 7.50 mm respectivamente), comparado a los días 4 y 5 (11.13 mm y 11.63 mm, respectivamente). El análisis de varianza indicó diferencias estadísticas significativas entre los días 4 y 6, 4 y 7, 4 y 8, 5 y 6, 5 y 7, 5 y 8 ($p < 0.05$).

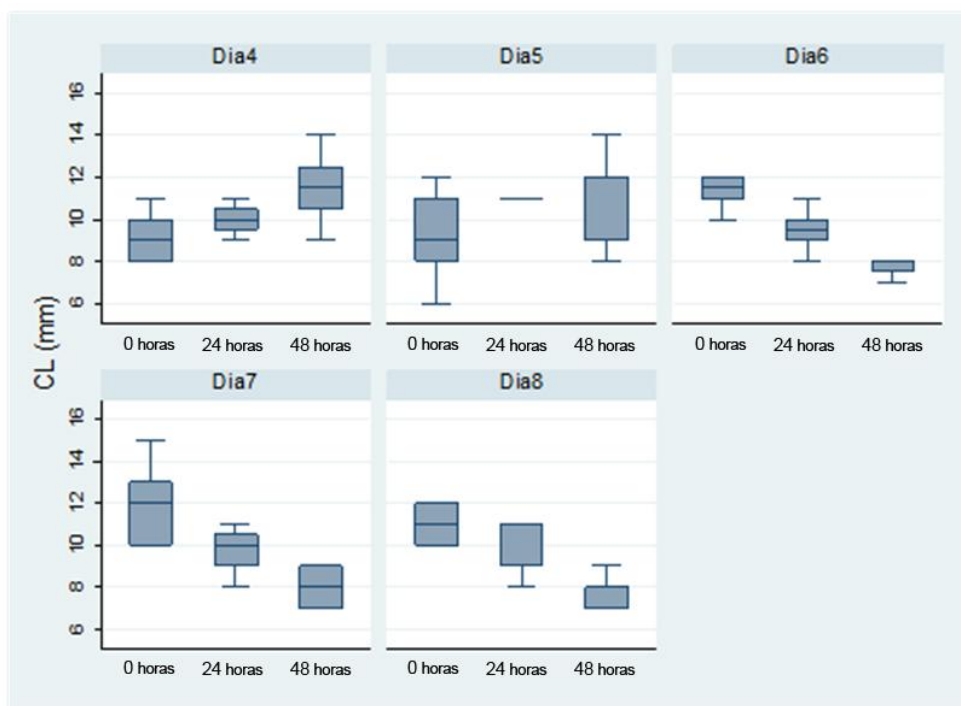
Cuadro 4. Diámetro del cuerpo lúteo (mm) post-aplicación de prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ para T1 en función al tiempo de evaluación.

Aplicación de $\text{PGF}_{2\alpha}$	Plasma seminal ($\bar{X} \pm \text{D.E.}$)		
	0 h	24 h	48 h
Día 4	8.63 ± 1.51	10.87 ± 1.26^a	11.13 ± 1.55^a
Día 5	9.38 ± 1.85	10.13 ± 1.36^a	11.63 ± 1.69^a
Día 6	11.25 ± 0.89	9.50 ± 1.20^a	7.88 ± 1.25^b
Día 7	12.50 ± 1.31	9.50 ± 1.31^a	8.00 ± 0.76^b
Día 8	12.00 ± 0.93	9.75 ± 0.71^a	7.50 ± 0.76^b

^{a,b} Superíndices diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$)
 $\text{PGF}_{2\alpha}$: Prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$

La figura 2 representa los valores de medianas y percentiles mediante Boxplots (gráficas en cajas) para los valores en el diámetro del cuerpo lúteo a las 0, 24 y 48 horas post-aplicación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ en los diferentes días. Como se puede apreciar, existe una clara tendencia de disminución del diámetro en el cuerpo lúteo en alpacas que recibieron $\text{PGF}_{2\alpha}$ a los días 6, 7 y 8 en comparación a los días 4, 5.

Figura 2. Representación de medianas y percentiles para el diámetro del cuerpo lúteo (mm) en alpacas del T1 post-aplicación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ en los días 4, 5, 6, 7 y 8.



CL: Cuerpo Lúteo

4.3.2. Alpacas inducidas a ovulación con GnRH

En relación a las alpacas del T2, a las 0 horas de la aplicación de $\text{PGF}_{2\alpha}$, los valores promedio más altos de diámetros del cuerpo lúteo se encontraron en alpacas que se les aplicó $\text{PGF}_{2\alpha}$ a los días 7, 6 y 8 (11.88 mm, 11.38 mm y 11.14 mm).

A las 24 horas post-aplicación de $\text{PGF}_{2\alpha}$, los valores promedio de diámetro comenzaron a disminuir para los días de aplicación 6, 7 y 8 (9.50 mm, 9.75 mm y 9.57 mm respectivamente) mientras que para las alpacas que se les aplicó a los días 4 y 5 fueron incrementando (10.00 mm y 11.00 mm, respectivamente). No obstante el análisis de varianza no reportó diferencias estadísticas significativas entre los días de aplicación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ sobre la susceptibilidad del CL ($p > 0.05$).

A las 48 horas post-aplicación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ los valores promedio más bajos en el diámetro del cuerpo lúteo se observaron en alpacas que recibieron $\text{PGF}_{2\alpha}$ a los días 6, 7 y 8 (7.88 mm, 8.00 mm y 7.71 mm respectivamente) comparado con los valores promedio de diámetro para alpacas que recibieron $\text{PGF}_{2\alpha}$ a los días 4 y 5

(11.50 mm y 11.14 mm respectivamente). Además se observó que 1 animal del día 5 disminuyó su diámetro del cuerpo lúteo. El análisis estadístico demostró diferencias significativas entre los días 6, 7 y 8 con el resto de los grupos ($p < 0.05$).

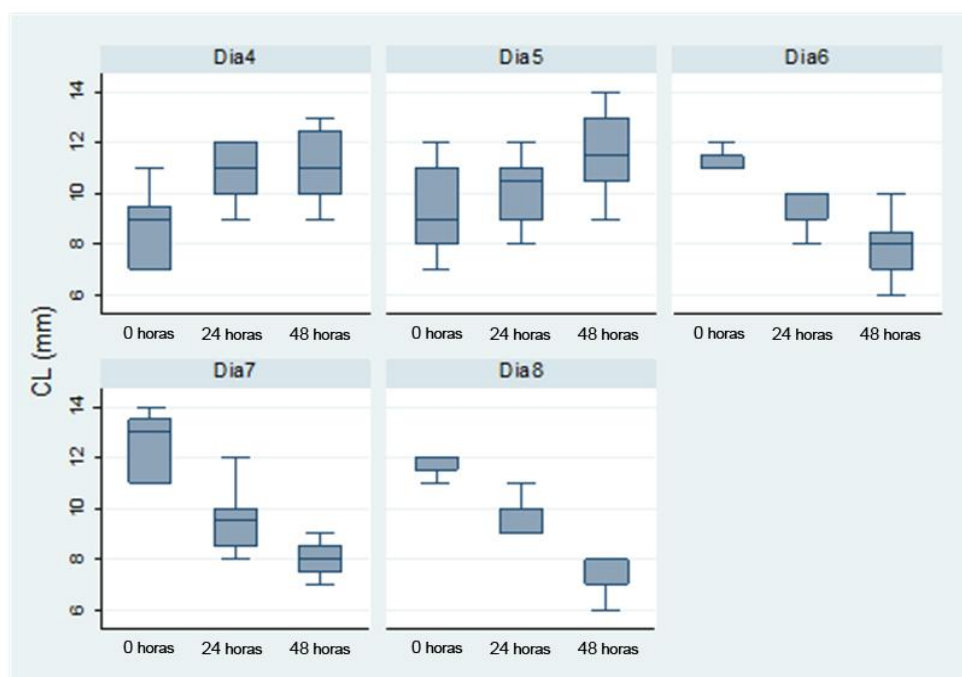
Cuadro 5. Diámetro del cuerpo lúteo (mm) post-aplicación de prostaglandina $F_{2\alpha}$ para T2 en función al tiempo de evaluación.

Aplicación de $PGF_{2\alpha}$	GnRH ($X \pm D.E.$)		
	0 h	24 h	48 h
Día 4	9.13 ± 1.26	10.00 ± 0.76^a	11.50 ± 1.60^a
Día 5	9.14 ± 2.04	11.00 ± 0.58^a	11.14 ± 2.04^a
Día 6	11.38 ± 0.74	9.50 ± 0.93^a	7.88 ± 0.64^b
Día 7	11.88 ± 1.81	9.75 ± 1.04^a	8.00 ± 0.93^b
Día 8	11.14 ± 0.90	9.57 ± 1.13^a	7.71 ± 0.76^b

^{a,b} Superíndices diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$)
 $PGF_{2\alpha}$: Prostaglandina $F_{2\alpha}$

La figura 3 representa los valores de medianas y percentiles en el diámetro del cuerpo lúteo a las 0, 24 y 48 horas luego de la aplicación de $PGF_{2\alpha}$ en los diferentes días de tratamiento. Se observa una disminución del diámetro del cuerpo lúteo cuando se les aplicó $PGF_{2\alpha}$ en los días 6, 7 y 8, mientras que las alpacas que se les aplicó $PGF_{2\alpha}$ a los días 4 y 5 se mantuvieron cierta tendencia al incremento de diámetro durante las horas de evaluación.

Figura 3. Representación de medianas y percentiles para el diámetro del cuerpo lúteo (mm) en alpacas del T2 post-aplicación de PGF_{2α} en los días 4, 5, 6, 7 y 8.



CL: Cuerpo Lúteo

En el cuadro 6 se puede observar los diámetros promedio registrados en el grupo control para ambos tratamiento de ovulación en diferentes días durante la fase luteal. Tanto para el tratamiento con plasma seminal así como con GnRH, se tiene que el cuerpo lúteo alcanza su mayor tamaño el día 8 post ovulación (12.14 y 11.43 respectivamente). Además se observa que al día 10 hay una disminución en el diámetro del cuerpo lúteo en ambos tratamientos.

Cuadro 6. Diámetro del cuerpo lúteo (mm) en el grupo control

Control	Día 4	Día 7	Día 8	Día 10	Día 11	Día 12	Día 14
PS	7.00 ± 0.58	11.43 ± 1.90	12.14 ± 1.21	10.00 ± 1.00	9.00 ± 1.73	8.29 ± 1.80	6.86 ± 2.34
GnRH	7.14 ± 1.46	9.71 ± 1.50	11.43 ± 0.98	9.86 ± 0.90	8.57 ± 1.13	8.00 ± 1.15	6.29 ± 0.95

PS: plasma seminal

GnRH: acetato de buserelina

4.3.3. Evaluación de los niveles de progesterona

Los niveles de progesterona post-aplicación de prostaglandina a los días 4, 5, 6, 7 y 8 son presentados en el cuadro 7. En relación al T1, a las 0 horas los valores promedio de progesterona fueron más altos en aquellas alpacas tratadas los días 7 y 8 (10.93 ng/ml y 9.39 ng/ml respectivamente). Por otro lado, a las 24 horas, los valores promedio para ambos días de aplicación disminuyeron considerablemente (0.70 ng/ml y 0.31 ng/ml respectivamente). En relación a los niveles de progesterona para las alpacas del T2, a las 0 horas los resultados promedio fueron más altos en alpacas que se les aplicó prostaglandina los días 6 y 7 (9.20 ng/ml y 10.14 ng/ml), pero estos valores disminuyeron a las 24 horas post-prostaglandina (1.55 y 0.76). También un animal del día 5 disminuyó las concentraciones de progesterona a las 24 horas post-aplicación de $\text{PGF}_{2\alpha}$.

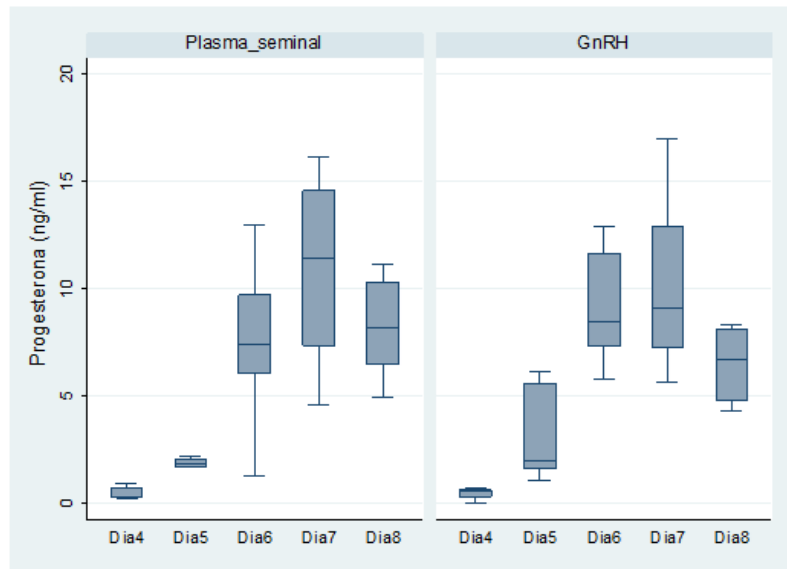
Cuadro 7. Perfiles de progesterona (ng/ml) post-aplicación de prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$

Niveles de progesterona	Plasma seminal		GnRH	
	(X ± D.E)		(X ± D.E)	
	0 h	24 h	0 h	24 h
DIA 4	0.47 ± 0.28	1.34 ± 0.51	0.46 ± 0.24	2.26 ± 0.93
DIA 5	1.87 ± 0.48	6.54 ± 2.98 ^a	2.96 ± 2.02	4.15 ± 2.36 ^a
DIA 6	7.57 ± 3.60	1.77 ± 0.73	9.20 ± 2.65	1.55 ± 0.44
DIA 7	10.93 ± 4.42	0.70 ± 0.26 ^b	10.14 ± 3.82	0.76 ± 0.71 ^b
DIA 8	9.39 ± 4.82	0.31 ± 0.18 ^b	6.32 ± 1.63	0.27 ± 0.17 ^b

^{a,b} Superíndices diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$)

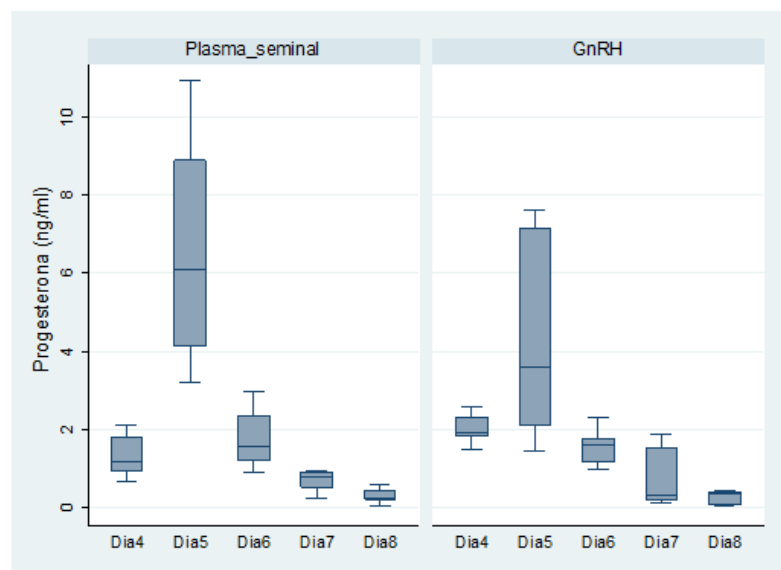
La figura 4 representa los valores de medianas y percentiles de perfiles de progesterona a las 0 horas. Los resultados indican que los valores de progesterona más altos post- $\text{PGF}_{2\alpha}$ se encontraron al día 6 y día 7 respectivamente, tanto para T1 y T2.

Figura 4. Representación de los valores de mediana y percentiles para el monitoreo de perfiles de progesterona en T1 y T2 a las 0 horas post-aplicación de $\text{PGF}_{2\alpha}$.



La figura 5 muestra como los niveles de progesterona a las 24 horas post-aplicación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ caen en los días 6, 7 y 8, tanto para T1 y T2. El análisis de varianza demostró diferencias significativas para los animales de T1 entre los grupos de $\text{PGF}_{2\alpha}$ aplicada a los días 5 y 7, 5 y 8 y entre 6 y 8 ($p < 0.05$). Para el T2 las diferencias se observaron entre los animales del día 4 y 8, 5 y 7, 5 y 8 ($p < 0.05$).

Figura 5. Representación de los valores de mediana y percentiles para el monitoreo de perfiles de progesterona en T1 y T2 a las 24 horas post-aplicación de $\text{PGF}_{2\alpha}$.



V. DISCUSIÓN

El hallazgo del factor inductor de ovulación como potente agente luteotrópico en los camélidos sudamericanos sigue investigándose con el fin de determinar los mecanismos involucrados causantes de ovulación, formación de cuerpo lúteo, luteólisis. Hasta el momento se sabe que es una proteína perteneciente a la familia de la neurotrofina llamada factor de crecimiento neural β encontrado en alpacas (Kershaw-Young *et al.*, 2012) y llamas (Ratto *et al.*, 2012), que actúa vía sistémica hasta llegar al hipotálamo o hipófisis desencadenando el pico preovulatorio de LH para la liberación del ovocito (Panez *et al.*, 2009; Salas *et al.*, 2011; Bogle *et al.*, 2012).

La tasa de ovulación obtenida en el presente trabajo fue de 97,92% (47/48) para plasma seminal y 93% (45/48) para GnRH, sin diferencia significativa entre ambos tratamientos. Estos resultados coinciden con reportes previos donde señalan tasas ovulatorias superiores al 90% (Adams *et al.*, 2005; López *et al.*, 2006; Palián, 2010) en llamas y alpacas. Por lo tanto el plasma seminal puede ser un tratamiento alternativo para la inducción de ovulación en los camélidos sudamericanos y evitar el uso de hormonas sintéticas y posiblemente usar en programas como inseminación artificial.

Los diámetros promedio del cuerpo lúteo en el grupo control para los animales inducidos a ovulación tanto con plasma seminal como con GnRH fueron similares y es el día 8 donde alcanza su mayor tamaño. Esto concuerda con lo hallado por Adams *et al* (2005) y Ulloa-Leal *et al* (2014), donde los perfiles de progesterona en estos días fueron mayores. Por otro lado las diferencias encontradas en cuanto al perfil de progesterona entre ambos trabajos fueron opuestas. Esto se debe a que el FIO es un agente luteotrópico dependiente de la dosis o concentración presente en el plasma seminal. Por lo tanto, al usar la proteína purificada en menor concentración (1mg) en comparación con el eyaculado de llama que contiene aproximadamente 12 mg (Tanco *et al.*, 2011) hace que el pico preovulatorio no sea tan consistente en el tiempo y la formación de progesterona no sea tan elevada.

La susceptibilidad encontrada tanto para plasma seminal como para GnRH al medir el diámetro del cuerpo lúteo por tres días consecutivos demostró diferencias significativas a las 48 horas post-aplicación de la PGF_{2α} en los días 6, 7 y 8 respecto a los días 4 y 5. Sin embargo, los animales evaluados el día 6, 7 y 8 para ambos tratamientos a las 24 horas demostraron una disminución en el diámetro más no una diferencia significativa respecto a día previo. Esto se puede explicar debido a que una luteólisis estructural lleva más horas en desaparecer todo el tejido luteal presente en el ovario debido al mecanismo fisiológico de apoptosis celular (Niswender *et al.*, 2000).

Con respecto a las mediciones de progesterona en suero se determinó que los animales tratados el día 7 y 8 tuvieron una luteólisis efectiva (<1ng/ml) tanto los inducidos con plasma seminal como los inducidos con GnRH. No obstante, animales tratados con PGF_{2α} al día 6 también sufrieron una regresión drástica en las mediciones de progesterona sin llegar al umbral de (<1ng/ml), al relacionarlo con el tamaño del cuerpo lúteo a las 48 horas post-estímulo se corrobora que ocurre una luteólisis. Estos resultados concuerdan con los hallados por Bianchi *et al.*, 2012 en llamas, donde encontraron que la inyección del cloprostenol sódico al día 6 y 8 indujo una luteólisis efectiva a las 24 horas post-tratamiento. Además se encontró que en el día 5 registró tres respuestas diferentes: un 27% (3/11) no causó ningún efecto, un 18% (2/11) ocurrió luteólisis y un 55% (6/11) evidenció una disminución transitoria de progesterona plasmática hacia las 24 horas, sin embargo al día

siguiente volvió a subir los valores plasmáticos de progesterona, con lo cual la fase luteal se prolongó 1 día más comparado con el grupo control. Similares resultados se vio en lleguas tratadas con prostaglandina al día 3 post ovulación (Bergfelt *et al.*, 2006) y ovejas en el día 5 con subdosis de prostaglandina (Juengel *et al.*, 2000). En el presente trabajo, el grupo inducidos a ovulación con GnRH y tratados con PGF_{2α} el día 5 registró a un animal que disminuyó las concentraciones de progesterona sérica a las 24 horas, que pudo ser una posible luteólisis o solo una disminución transitoria. Una posible explicación puede ser el intervalo que hay entre inducción de ovulación y ovulación puede generar que el cuerpo lúteo tenga más horas para ser sensible a la prostaglandina exógena.

En el presente estudio la falta de sensibilidad del cuerpo lúteo acción del análogo de PGF_{2α} en los días 4 y 5 se puede deber a deficiente activación enzimática para formar la prostaglandina. Se pensaba que la falta de receptores para PGF_{2α} a nivel de las células luteales grandes explicaba dicho fenómeno, pero estudios en vacas (Tsai y Wiltbank, 1998) y ovejas (Juengel *et al.*, 1996) afirmaron que estaban presente 2 días después de la ovulación. También se propuso que el mecanismo enzimático durante los primeros días post-ovulación sería mayor el catabolismo de la PGF_{2α} por la enzima 15-PG deshidrogenasa (PGDH) (Tsai *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2000). Sin embargo, esta teoría fue rechazada por Arosh *et al* (2004), ya que encontraron en bajos niveles la enzima PGDH a través de toda la fase luteal en vacas. Asimismo afirmaron que los primeros días de formación del cuerpo lúteo hay una disponibilidad limitada de transportadores para PG y aumento en la expresión de la PGE₂, lo cual indica que hay más un efecto luteotrópico. Otro mecanismo propuesto para el periodo refractario del cuerpo lúteo es la falta de producción de endotelina-1, que es un péptido vasoconstrictor mediador de la regresión luteal (Levy *et al.*, 2000).

Por consiguiente, se puede afirmar en base a los resultados obtenidos en el presente trabajo, que la susceptibilidad del cuerpo lúteo a la acción de la prostaglandina F_{2α} en alpacas inducidas a ovulación con plasma seminal es a partir del día 6 post-ovulación y no es diferente con respecto al tratamiento con GnRH, con lo cual nos permite establecer protocolos para inducir ovulación en alpacas con el análogo de prostaglandina.

VI. CONCLUSIONES

El cuerpo lúteo es sensible a la acción de la prostaglandina $F_{2\alpha}$ en alpacas inducidas a ovulación con plasma seminal a partir del día 6 post-inducción de ovulación.

VII. LITERATURA CITADA

1. Aba MA, Forsberg M, Kindahl H, Sumar J y Edqvist L. 1995. Endocrine changes after mating in pregnant and non-pregnant llamas and alpacas. *Acta Vet Scand.* 36: 489-498.
2. Aba MA, Kindahl H, Forsberg M, Quiroga M, Auza N. 2000. Levels of progesterone and changes in prostaglandin $F_{2\alpha}$ release during luteolysis and early pregnancy in llamas and the effect of treatment with flunixin meglumine. *Anim Reprod Sci.* 59: 87-97.
3. Adams GP, Griffin PG, Ginther OJ. 1989. In situ morphologic dynamics of ovaries, uterus, and cervix in llamas. *Biol Reprod.* 41: 551-558.
4. Adams GP, Sumar J, Ginther OJ. 1990. Effects of lactational and reproductive status on ovarian follicular waves in llamas (*Lama glama*). *J Reprod Fert.* 90: 535-545.
5. Adams GP, Sumar J, Ginther OJ. 1991. Form and function of the corpus luteum in llamas. *Anim Reprod Sci.* 24: 127-138.
6. Adams GP, Ratto MH. 2001. Reproductive biotechnology in South American Camelids. *Rev Inv Vet Perú. Suppl. 1:* 134-141.
7. Adams GP, Ratto MH, Huanca W, Singh J. 2005. Ovulation-inducing factor in the seminal plasma of alpacas and llamas. *Biol Reprod.* 73: 452-457.
8. Arosh JA, Banu SK, Chapdalaine P, Madore E, Sirois J, Fortier MA. 2004. Prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling in corpus luteum: A basis for autoregulation of luteal function. *Endocrinology.* 145: 2551-2560.
9. Bakker J, Baum M. 2000. Neuroendocrine regulation of GnRH release in induced ovulators. *Neuroendocrinology.* 21: 220-262.
10. Bergfelt DR, Pierson RA, Ginther OJ. 2006. Regression and resurgence of the CL following $PGF_{2\alpha}$ treatment 3 days after ovulation in mares. *Theriogenology* 65, 1605-1619.
11. Bianchi CP, Meikle A, Sartore I, González F, Aba MA. 2007. Uterine estrogen receptor alpha and progesterone receptor during the follicular and luteal phase in llamas. *Anim Reprod Sci.* 99:117-126.
12. Bianchi CP, Cavilla MV, Jorgensen E, Benavente MA, Aba MA. 2012. Development of corpus luteum susceptibility to an analog of prostaglandin $F_{2\alpha}$, throughout the luteal phase in llamas (*Lama glama*). *Anim Reprod Sci.* 131: 199-203.
13. Bogle OA, Ratto MH, Adams GP. 2011. Evidence for the conservation of biological activity of ovulation-inducing factor in seminal plasma. *Reproduction.* 142: 277-283.
14. Bogle OA, Ratto MH, Adams GP. 2012. Ovulation-inducing factor (OIF) induces LH secretion from pituitary cells. *Anim Reprod Sci.* 133: 117-122.

15. Bravo W, Sumar J. 1989. Laparoscopic examination of the ovarian activity in alpacas. *Anim Reprod Sci.* 21: 271-281.
16. Bravo W, Fowler ME, Stabenfeldt GH, Lasley BL, 1990a. Ovarian follicular dynamics in the llama. *Biol Reprod.* 43: 579-585.
17. Bravo W, Fowler ME, Stabenfeldt GH, Lasley BL. 1990b. Endocrine responses in the llama to copulation. *Theriogenology.* 33: 891-899.
18. Bravo W, Stabenfeldt GH, Lasley BL, Fowler ME. 1991. The effect of ovarian follicular size on pituitary and ovarian responses to copulation in domesticated South American Camelids. *Biol Reprod.* 45: 553-559
19. Bravo W, Stabenfeldt GH, Fowler ME, Lasley BL. 1992. Pituitary response to repeated copulation and/or gonadotropin-releasing hormone administration in llamas and alpacas. *Biol Reprod.* 47: 884-888.
20. Bravo W. 1994. Reproductive endocrinology of llamas and alpacas. *Vet Clin North Am. Food Anim Pract.* 10: 265-279.
21. Bravo W, Fowler ME, Lasley BL. 1994. The postpartum llama: Fertility after parturition. *Biol Reprod.* 51: 1084-1087.
22. Bravo W, Moscoso J, Ordoñez C, Alarcon V. 1996. Transport of spermatozoa and ova in female alpaca. *Anim Reprod Sci.* 43: 173-179.
23. Bravo W, Skidmore JA, Zhao X. 2000. Reproductive aspects and storage of semen camelidae. *Anim Reprod Sci.* 62: 173-193.
24. Brown B. 2000. A review on reproduction in South American camelids. *Anim Reprod Sci.* 58: 169-195.
25. Chaves MG, Aba M, Agüero A, Egey J, Berestin V, Rutter B. 2002. Ovarian follicular wave pattern and the effect of exogenous progesterone on follicular activity in non-mated llamas. *Anim Reprod Sci.* 69: 37-46.
26. Chen BX, Yuen ZX, Pan GW. 1985. Semen-induced ovulation in the Bactrian camel (*Camelus bactrianus*). *J Reprod Fert.* 73: 335-339.
27. Clarke IJ, Thomas GB, Yao B, Cummins JT. 1987. GnRH secretion throughout the ovine estrous cycle. *Neuroendocrinology.* 46: 82-88.
28. Davis GH, Dodds KG, Moore GH, Bruce GD. 1997. Seasonal effects on gestation length and birth weight in alpacas. *Anim Reprod Sci.* 46: 297-303.
29. Del Campo MR, Del Campo CH, Ginther OJ. 1996. Vascular provisions for a local utero-ovarian cross-over pathway in New World Camelids. *Theriogenology.* 46: 983-991.
30. Diaz FJ, Anderson LE, Wu YL, Rabot A, Tsai SJ, Wiltbank MC. 2002. Regulation of progesterone and prostaglandin F_{2α} production in the CL. *Mol Cell End.* 1991: 65-80.

31. England BG, Foote WC, Cardozo AG, Matthews DH, Riera S. 1971. Oestrus and mating behaviour in the llama (*Lama glama*). Anim Behav. 19: 722-726.
32. Farin CE, Nett TM, Niswender GD. 1990. Effects of luteinizing hormone on luteal cell populations in hypophysectomized ewes. J Reprod Fert. 88: 61-70.
33. Fernández-Baca S, Novoa C. 1968. Conducta sexual de la alpaca (*Lama pacos*) en empadre en campo. En: Resúmenes de las investigaciones del IVITA en CSA. Publicación IVITA No 25.
34. Fernández-Baca S, Madden DH, Novoa C. 1970. Effect of different mating stimuli on induction of ovulation in the alpaca. J Reprod Fert. 22: 261-267.
35. Fernández-Baca S, Novoa C, Sumar J. 1972a. Actividad reproductiva en la alpaca mantenida en separación del macho. Mem. ALPA. 7: 7-18.
36. Fernández-Baca S, Sumar J, Novoa C. 1972b. Comportamiento sexual de la alpaca macho frente a la renovación de las hembras. Rev Inv Pec IVITA Univ San Marcos. 1: 115-128.
37. Fernández-Baca S, Sumar J, Novoa C. 1973. Relación entre la ubicación del cuerpo lúteo y la localización del embrión en la alpaca. Revista Inv. Pecuarias. (IVITA) UNMSM. Lima-Perú. 2: 131-135.
38. Fernández-Baca S, Hansel W, Saatman R., Sumar J, Novoa C. 1979. Differential luteolytic effects of right and left uterine horns in the alpaca. Biol Reprod. 20: 586-595.
39. Fernández-Baca S. 1991. Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos. FAO. ONU. Chile. p 1-3.
40. Fernández Baca S. 1993. Manipulation of reproductive functions in male and female new world camelids. Anim Reprod Sci. 33: 307-323.
41. Fortune JE. 1994. Ovarian follicular growth and development in mammals. Biol Reprod. 50: 225-232.
42. Fowler ME. 1998. Medicine and surgery of South American Camelids. Llama, Alpaca, Vicuña, Guanaco. 2ed. Iowa. Blackwell Publishing. 560 p.
43. Franco E, Sumar J, Varela M. 1981. Eyaculación en la alpaca (*Lama pacos*). IV Convención Internacional sobre Camélidos Sudamericanos. Corporación Nacional Forestal. Instituto de la Patagonia, Chile, Punta Arenas, 22-27 de noviembre.
44. Garnica J, Achata R, Bravo PW. 1993. Physical and biochemical characteristics of alpaca semen. Anim Reprod Sci. 32: 85-90.
45. Ginther OJ, Kastelic JP, Knopf L. 1989. Temporal associations among ovarian events in cattle during estrous cycles with two and three follicular waves. J Reprod Fert. 87: 223-230.

46. Ginther OJ, Bergfelt DR, Kulick LJ, Kot K. 1998. Pulsatility of systemic FSH and LH concentrations during follicular-wave development in cattle. *Theriogenology* 50: 507-519.
47. Huanca W, Cárdenas O, Olazábal C, Ratto M, Adams GP. 2001. Efecto hormonal y empadre sobre el intervalo a la ovulación en llamas. *Rev Inv Vet Perú*. 1: 462-463
48. Juengel JL, Nett TM, Tandeski TR, Eckery DC, Sawyer HR, Niswender GD. 1995. Effect of luteinizing hormone and growth hormone on luteal development in hypophysectomized ewes. *Endocrine*. 3: 323-326
49. Juengel JL, Wiltbank MC, Meberg BM, Niswender GD. 1996. Regulation of steady-state concentrations of messenger ribonucleic acid encoding prostaglandin F_{2α} receptor in ovine corpus luteum. *Biol Reprod*. 54: 1096-1102.
50. Juengel JL, Haworth JD, Rollyson MK, Silva PJ, Sawyer HR, Niswender GD. 2000. Effect of dose of prostaglandin F_{2α} on steroidogenic components and oligonucleosomes in ovine luteal tissue. *Biol Reprod*. 62: 1047-1051.
51. Juyena NS, Stelletta C. 2012. Seminal plasma: An essential attribute to spermatozoa. *Journal of Andrology*. 33(4): 536-551.
52. Kershaw-Young C, Druart X, Vaughan J, Maxwell W. 2012. β-Nerve growth factor is a major component of alpaca seminal plasma and induces ovulation in female alpacas. *Reprod Fert Dev*. 24:1093-1097.
53. Kobayashi S, Berisha B, Amselgruber WM, Schams D, Miyamoto A. 2001. Production and localization of angiotensin II in the bovine early corpus luteum: a possible interaction with luteal angiogenic factors and prostaglandine F_{2α}. *Endocrinology*. 170: 369-380.
54. Levy N, Kobayashi S, Roth Z, Wolfenson D, Miyamoto A, Meidan R. 2000. Administration of prostaglandin F_{2α} during early bovine luteal phase does not alter the expression of ET-1 and of its type A receptor: a possible cause for corpus luteum refractoriness. *Biol Reprod*. 63: 377-382.
55. Leyva V, Sumar J. 1981. Evaluación del peso corporal al empadre sobre la capacidad reproductiva de hembras alpaca de un año de edad. En: IV Conv Internacional Camélidos Sudamericanos. Punta Arenas, Chile.
56. Leyva V, García W. 1999a. Efecto de la progesterona exógena sobre la función del cuerpo lúteo de alpacas. En: Res II Cong Mund Camélidos, Cusco. Perú. pp 87.
57. Leyva V, García W. 1999b. Efecto de la prostaglandina sobre la vida del cuerpo lúteo en alpacas. II Congreso Mundial sobre Camélidos. Cusco-Perú. pp 88.

58. López A, Huanca W, Leyva V. 2006. Inducción de la ovulación en llamas mediante la administración intramuscular del plasma seminal de llama, alpaca y toro. *Rev Inv Vet.* 17 (2): 114-118.
59. Marín JC, Zapata B, González BA, Bonacic C, Wheeler JC, Casey C. 2007. Systematics, taxonomy and domestication of alpacas and llamas: new chromosomal and molecular evidence. *Rev Chil Hist Nat.* 80: 121-140.
60. McCracken JA, Custer EE, Lamsa JC. 1999. Luteolysis: A Neuroendocrine-Mediated Event. *Physiological reviews.* 79 (2): 263-323.
61. Miragaya MH, Aba MA, Capdevielle EF, Ferrer MS, Chaves MG, Rutter B, Agüero A. 2004. Follicular activity and hormonal secretory profile in vicuna (*Vicugna vicugna*). *Theriogenology.* 61: 663-671.
62. Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, McIntush EW. 2000. Mechanisms Controlling the Function and Life Span of the Corpus Luteum. *Physiol Rev.* 80: 1-29.
63. Noakes DE, Parkinson TK, England GC. 2009. *Veterinary Reproduction and Obstetrics.* 9° ed. Sydney. Elsevier. 950 p.
64. Novoa C. 1970. Reproduction in Camelidae. *J Reprod Fert.* 22: 3-20.
65. Novoa C, Fernández-Baca S, Sumar J, Leyva V. 1972. Pubertad en la Alpaca. *Rev Inv Vet.* 1: 29-35.
66. Novoa C, Leyva V. 1996. Reproducción en alpacas y llamas. Fondo Contravalor Perú-Suiza, CISA/IVITA, Fac Med Vet Univ Nac Mayor de San Marcos (Serie Publ IVITA N° 26). 30 p.
67. Palian JW. 2010. Inducción de ovulación con plasma seminal o análogo de GnRH (acetato de Buselerina) y su efecto sobre la tasa de concepción en alpacas (*Vicugna pacos*), inseminadas con semen fresco. Tesis de Médico Veterinario. Lima. Univ Nac Mayor de San Marcos. 66p.
68. Panez S, Huanca W, Huanca T, Ratto M, Adams G. 2009. Efecto del sitio de deposición del plasma seminal sobre la tasa de ovulación y formación del cuerpo lúteo en alpacas. *Rev Inv Vet Perú.* 20(1): 21-27.
69. Paolicchi F, Urquieta B, Del Valle L, Bustos-Obregón E. 1999. Biological activity of the seminal plasma of alpacas: stimulus for the production of LH by pituitary cells. *Anim Reprod Sci.* 54: 203-210.
70. Pollard JC, Littlejohn RP, Moore GH. 1995. Seasonal and other factors affecting the sexual behaviour of alpacas. *Anim Reprod Sci.* 37: 349-356.
71. Ratto MH, Huanca W, Singh J, Adams GP. 2005. Local versus systemic effect of ovulation-inducing factor in seminal plasma of alpacas. *Reprod Biol Endocr.* 3:29.

72. Ratto MH, Huanca W, Singh J, Adams GP. 2006. Comparison of the effect of ovulation-inducing factor (OIF) in the seminal plasma of llamas, alpacas, and bulls. *Theriogenology*. 66: 1102-1106.
73. Ratto MH, Huanca W, Adams GP. 2010. Ovulation-inducing factor: a protein component of llama seminal plasma. *Biol Reprod End*. 8:44.
74. Ratto MH, Delbaere LT, Leduc YA, Pierson RA, Adams GP. 2011. Biochemical isolation and purification of ovulation-inducing factor (OIF) in seminal plasma of llamas. *Reprod Biol End*. 9: 24.
75. Ratto MH, Leduc YA, Valderrama XP, van Straaten KE, Delbaere LT, Pierson RA, et al. 2012. The nerve of ovulation-inducing factor in semen. *Proc Natl Acad Sci*. 109:15042-15047.
76. Ríos M. 1989. Presencia de un factor de inducción de ovulación en el semen de alpaca y toro. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ Nac Mayor de San Marcos. 39p.
77. San-Martin M, Copaira M, Zúñiga J, Rodríguez R, Bustinza G, Acosta L. 1968. Aspects of reproduction in the alpaca. *J Reprod Fert*. 16: 395-399.
78. Sato A, Montoya L. 1990. Aparato reproductor de la alpaca (*Lama pacos*), Anatomía macroscópica. *Rev. Camélidos Sudamericanos*. 7: 13.
79. Senger PL. 2005. Pathways to pregnancy and parturition. 2° ed. EE.UU. Cadmus Professional Communications. 373 p.
80. Silva PJ, Juengel JL, Rollyson MK, Niswender GD. 2000. Prostaglandin metabolism in the ovine corpus luteum: catabolism of prostaglandin $F_{2\alpha}$ coincides with resistance of the corpus luteum to $PGF_{2\alpha}$. *Biol Reprod*. 63: 1229-1236.
81. Silva ME, Smulders JP, Guerra M, Valderrama XP, Letelier C, Adams GP, Ratto MH. 2011. Cetorelix suppresses the preovulatory LH surge and ovulation induced by ovulation-inducing factor (OIF) present in llama seminal plasma. *Reprod Biol End*. 9:74.
82. Silva M, Nino A, Guerra M, Letelier C, Valderrama XP, Adams GP, Ratto MH. 2011. Is an ovulation-inducing factor (OIF) present in the seminal plasma of rabbits?. *Anim. Reprod. Sci*. 127: 213-221.
83. Silva ME, Recabarren MP, Recabarren SE, Adams GP, Ratto MH. 2012. Ovarian estradiol modulates the stimulatory effect of ovulation-inducing factor (OIF) on pituitary LH secretion in llamas. *Theriogenology*. 77: 1873-1882.
84. Smith CL, Peter AT, Pugh DG. 1994. Reproduction in llamas and alpacas: a review. *Theriogenology*. 41: 573-592.
85. Stevenson JS. 2007. Clinical reproductive physiology of the cow. En: *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. 2° ed. USA. Elsevier. pp 258-270.

86. Sumar J. 1983. Studies on reproductive pathology in alpacas. MS Thesis, Department of Obstetrics and Gynaecology, College of Veterinary Medicine, Swedish University of Agriculture and Science, Uppsala. pp. 9-103.
87. Sumar J. 1985. Reproductive physiology in South American Camelids. En Land RB, Robinson DW. Genetics of Reproduction in Sheep. Butterworths. London. pp. 81-95.
88. Sumar J, Fredriksson G, Alarcon V, Kindahl H, Edqvist LE. 1988. Levels of 15-keto-13, 14-dihydro-PFG_{2α}, progesterone and oestradiol-17β after induced ovulations in llamas and alpacas. Acta Vet Scand. 29: 339-346.
89. Sumar J y Bravo W. 1991. In situ observation of the ovarian of llamas and alpacas by use of a laparoscopic technique. J Anim Vet Med Asoc. 199. 1159-1163.
90. Sumar, J. 1993. Efectos de los estímulos de inducción en la ovulación de alpacas y llamas. Rev Inv Pec. IVITA. Unmsm. Lima. Perú. 6 (1): 17-21.
91. Sumar J, Bravo PW, Foote WC. 1993. Sexual receptivity and time of ovulation in alpacas. Small Rumin Res. 11: 143-150.
92. Sumar J. 1996. Reproduction in llamas and alpacas. Anim Reprod Sci. 42: 405-415.
93. Tanco VM, Ratto MH, Lazzarotto M, Adams GP. 2011. Dose-response of female llamas to ovulation-inducing factor from seminal plasma. Biol Reprod. 85: 452-456.
94. Tsai SJ, Wiltbank MC. 1997. Prostaglandin F_{2α} induces expression of prostaglandin G/H synthase-2 in the ovine corpus luteum: a potential positive feedback loop during luteolysis. Biol Reprod. 57: 1016-1022.
95. Tsai SJ, Wiltbank MC. 1998. Prostaglandin F_{2α} regulates distinct physiological changes in early and mid-cycle bovine corpora lutea. Biol Reprod. 58: 346-352.
96. Ulloa-Leal C, Bogle O, Adams G, Ratto M. 2014. Luteotrophic effect of ovulation-inducing factor/nerve growth factor present in the seminal plasma of llamas. Theriogenology. 81: 1101-1107.
97. Vaughan JL. 2001. Control of ovarian follicular growth in the alpaca (*Lama pacos*). PhD. Thesis. Central Queensland University. 328 p.
98. Vaughan JL, Macmillan KL, D'Occhio MJ. 2004. Ovarian follicular wave characteristics in alpacas. Anim Reprod Sci. 80: 353-361.
99. Vaughan JL, Tibary A. 2006. Reproduction in female South American Camelids: a review and clinical observations. Small Rumin Res. 61: 259-281.
100. Wiltbank MC, Shiao TF, Bergfelt DR, Ginther OJ. 1995. Prostaglandin F_{2α} receptors in the early bovine corpus luteum. Biol Reprod. 52: 74-78.

VIII. APÉNDICE

APÉNDICE 1: GRUPOS DE TRATAMIENTO CON PROSTAGLANDINA F_{2α}

ID	Arete	Folículo Inicial	Inductor de Ovulación	Ovuló	C.L (0h) mm	C.L (24h) mm	C.L (48h) mm	P ₄ (0h) ng/ml	P ₄ (24h) ng/ml
GRUPO 1: DÍA 4									
1	000237	9mm OD	PS	Si	9	12	13	0.6736	1.0535
2	310203	9mm OD	GnRH	Si	8	9	11	0.0044	2.0715
3	116104	8mm OI	GnRH	Si	10	11	12	0.6615	2.5898
4	253203	9mm OI	GnRH	Si	9	10	13	0.3682	4.4337
5	179103	8mm OD	PS	Si	9	12	13	0.1803	0.8932
6	151103	9mm OI	PS	Si	10	10	11	0.9259	2.1182
7	090103	9mm OI	GnRH	Si	11	11	14	0.5537	1.9037
8	363204	11mm OD	PS	Si	11	12	12	0.261	1.8723
9	108103	13mm OI	PS	Si	9	11	11	0.3426	1.7249
10	S.A,	12mm OD	GnRH	Si	10	10	12	0.5896	1.9586
11	128104	8mm OD	PS	Si	7	10	9	0.3078	1.2071
12	310203	8mm OI	GnRH	Si	8	9	9	0.2028	1.4854
13	060104	9mm OD	PS	Si	7	9	9	0.2992	0.6829
14	362203	8mm OD	GnRH	Si	9	10	10	0.5872	1.8087
15	387203	12mm OD	PS	Si	7	11	11	0.7769	1.1463
16	116104	10mm OI	GnRH	Si	8	10	11	0.6865	1.8473
GRUPO 2: DÍA 5									
17	007607	7mm OD	GnRH	Si	12	10	9	5.5697	3.1964
18	169106	8mm OD	PS	Si	11	12	14	1.0748	3.4601
19	070103	10mm OD	PS	Si	11	11	13	1.6918	10.9199
20	363204	12mm OI	PS	Si	12	9	11	2.7905	6.1978
21	152103	11mm OI	GnRH	Si	11	11	12	2.5246	3.898
22	275204	8mm OI	GnRH	No	-	-	-	-	-
23	412304	9mm OI	PS	Si	9	10	11	1.749	5.988
24	132105	8mm OI	PS	Si	9	9	10	2.1796	10.8848
25	S.N.	9mm OD	PS	Si	9	11	13	1.827	4.794
26	045106	11mm OD	GnRH	Si	10	12	14	1.6037	7.5971
27	305204	8mm OI	GnRH	Si	9	11	12	1.9625	7.149
28	006406	8mm OI	GnRH	Si	8	11	11	1.8585	3.5965
29	231203	8mm OD	PS	Si	7	8	9	1.7818	6.8738
30	130105	8mm OD	PS	Si	7	11	12	1.903	3.197
31	350203	7mm OI	GnRH	Si	8	11	8	6.1128	1.4719
32	143105	8mm OD	GnRH	Si	6	11	12	1.0729	2.1319
GRUPO 3: DÍA 6									
33	231203	8mm OD	PS	Si	11	9	7	1.2486	0.9097
34	182103	11mm OD	GnRH	Si	12	11	8	12.932	2.2993
35	123104	10mm OI	GnRH	Si	12	10	8	12.530	1.0223
36	042106	10mm OI	GnRH	Si	12	8	7	7.1795	0.98
37	286203	11mm OI	PS	Si	12	9	8	6.2171	2.9602
38	353204	9mm OI	PS	Si	10	9	8	6.9305	1.0496
39	130105	10mm OD	PS	Si	11	8	6	5.84	1.3343
40	350203	9mm OI	GnRH	Si	10	9	8	5.8102	1.5308
41	269203	9mm OD	PS	Si	11	9	7	7.8884	1.8263
42	366204	9mm OI	GnRH	Si	11	9	7	9.4156	1.697

43	072104	10mm OD	GnRH	Si	11	10	8	7.5047	1.3299
44	353204	11mm OD	PS	Si	11	10	9	11.569	2.2384
45	286203	11mm OI	GnRH	Si	12	9	8	7.4111	1.6732
46	269203	9mm OD	PS	Si	11	10	8	7.8855	1.3393
47	182103	8mm OI	GnRH	Si	11	10	9	10.789	1.8407
48	384203	10mm OI	PS	Si	13	12	10	12.994	2.4812
GRUPO 4: DÍA 7									
49	008606	9mm OI	GnRH	Si	12	10	8	17.002	1.5351
50	S.N.	7mm OI	GnRH	Si	12	10	9	13.476	0.1505
51	S.A.	9mm OD	PS	Si	13	10	8	16.133	0.9473
52	091104	9mm OD	PS	Si	11	8	7	10.02	0.2489
53	337204	10mm OD	GnRH	Si	10	9	7	5.6364	0.3182
54	S.A	11mm OD	PS	Si	13	9	8	14.529	0.8109
55	0123210	9mm OI	GnRH	Si	10	9	7	8.8367	-
56	006906	10mm OI	PS	Si	11	9	8	4.6132	-
57	S.A.	9mm OI	GnRH	Si	10	8	7	9.3694	0.2648
58	S.N.	8mm OI	PS	Si	14	12	9	14.621	0.5249
59	S.N.	9mm OD	GnRH	Si	13	10	9	7.011	0.2253
60	108103	12mm OI	PS	Si	14	10	8	10.158	0.9241
61	283203	10mm OI	GnRH	Si	15	11	8	12.288	0.9282
62	412304	7mm OD	PS	Si	11	8	7	4.7003	0.5631
63	253203	11mm OI	GnRH	Si	13	11	9	7.5128	1.8995
64	363204	11mm OD	PS	Si	13	10	9	12.695	0.8633
GRUPO 5: DÍA 8									
65	123104	8mm OI	PS	Si	14	11	8	20.314	0.3561
66	072104	9mm OI	GnRH	Si	11	9	8	6.9298	0.0609
67	281205	9mm OI	PS	Si	12	9	8	9.4962	0.2448
68	286203	10mm OI	PS	Si	11	10	8	8.2241	0.2126
69	353204	9mm OI	PS	Si	12	9	6	8.1013	0.0621
70	S.N.	9mm OD	GnRH	No	-	-	-	-	-
71	130105	9mm OI	PS	Si	12	9	8	9.9342	0.2709
72	350203	9mm OI	GnRH	Si	12	9	8	5.0498	0.353
73	269203	9mm OD	GnRH	Si	10	8	7	6.6975	0.3963
74	384203	9mm OD	GnRH	Si	12	11	8	8.146	0.4137
75	188103	9mm OD	GnRH	Si	10	9	7	8.3246	0.4562
76	366204	8mm OI	PS	Si	11	10	7	11.120	0.5231
77	145106	11mm OI	GnRH	Si	12	11	9	4.7684	0.1265
78	132105	10mm OD	PS	Si	12	10	8	6.0646	0.2384
79	004505	10mm OI	GnRH	Si	11	10	7	4.2941	0.0979
80	090103	9mm OI	PS	Si	12	10	7	6.8256	0.6054

GRUPO 6: CONTROL											
ID	Arete	Folículo Inicial	Inductor de Ovulación	Ovuló	CL (mm) Día 4	CL (mm) Día 7	CL (mm) Día 8	CL (mm) Día 10	CL (mm) Día 11	CL (mm) Día 12	CL (mm) Día 14
81	S.N.	10mm OD	PS	Si	7	10	12	11	10	8	7
82	337204	11mm OD	PS	Si	7	12	13	11	10	9	6
83	353204	8mm OI	PS	Si	7	12	11	11	12	12	12
84	178105	8mm OD	PS	Si	7	12	14	10	8	8	6
85	100105	9mm OD	PS	Si	8	14	13	9	7	7	6
86	412205	8mm OI	PS	Si	6	12	11	9	8	7	6
87	269203	10mm OI	PS	Si	7	8	11	9	8	7	5
88	129806	11mm OI	PS	No	-	-	-	-	-	-	-
89	078906	7mm OI	GnRH	Si	10	11	12	10	8	8	6
90	021105	9mm OD	GnRH	Si	7	12	13	11	10	9	6
91	S.N.	7mm OI	GnRH	Si	6	10	11	9	8	6	5
92	231203	10mm OI	GnRH	Si	8	10	12	11	10	9	7
93	110104	10mm OD	GnRH	Si	6	8	10	9	8	8	6
94	389206	10mm OD	GnRH	Si	6	8	11	10	9	9	8
95	128104	10mm OD	GnRH	Si	7	9	11	9	7	7	6
96	158605	12mm OI	GnRH	No	-	-	-	-	-	-	-

APÉNDICE 2: CUADROS ESTADÍSTICOS

FOLICULOS INICIALES

tratamiento	N	mean	sd	p50
1	48	9.416667	1.33422	9
2	48	9.229167	1.292196	9
Total	96	9.322917	1.30984	9

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	.84375	1	.84375	0.49	0.4860
Within groups	162.145833	94	1.72495567		
Total	162.989583	95	1.71567982		

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(1) = 0.0476$ Prob> $\chi^2 = 0.827$

TASA DE OVULACIÓN

ovulo	tratamiento		Total
	1	2	
0	3	9	12
	2.08	6.25	4.17
1	141	135	276
	97.92	93.75	95.83
Total	144	144	288
	100.00	100.00	100.00

Fisher's exact = 0.138
1-sided Fisher's exact = 0.069

CUERPO LÚTEO

TRATAMIENTO = 1 TIEMPO = 0

pgf	N	mean	sd	p50
4	8	8.625	1.505941	9
5	8	9.375	1.846812	9
6	8	11.25	.8864053	11
7	8	12.5	1.309307	13
8	8	12	.9258201	12
9	7	7	.5773503	7
Total	47	10.19149	2.280716	11

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	174.026596	5	34.8053191	21.87	0.0000
Within groups	65.25	41	1.59146341		
Total	239.276596	46	5.20166512		

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(5) = 9.7591$ Prob> $\chi^2 = 0.082$

Comparison of cl by pgf (Bonferroni)					
Row Mean- Col Mean	4	5	6	7	8
5	.75 1.000				
6	2.625 0.002	1.875 0.074			
7	3.875 0.000	3.125 0.000	1.25 0.814		
8	3.375 0.000	2.625 0.002	.75 1.000	-5 1.000	
9	-1.625 0.254	-2.375 0.011	-4.25 0.000	-5.5 0.000	-5 0.000

TRATAMIENTO = 1 TIEMPO = 1

pgf	N	mean	sd	p50
4	8	10.875	1.125992	11
5	8	10.125	1.356203	10.5
6	8	9.5	1.195229	9
7	8	9.5	1.309307	9.5
8	8	9.75	.7071068	10
9	7	11.42857	1.902379	12
Total	47	10.17021	1.419111	10

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	23.6740122	5	4.73480243	2.81	0.0283
Within groups	68.9642857	41	1.68205575		
Total	92.6382979	46	2.01387604		

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(5) = 5.9207$ Prob> $\chi^2 = 0.314$

Comparison of cl by pgf (Bonferroni)					
Row Mean- Col Mean	4	5	6	7	8
5	-.75 1.000				
6	-1.375 0.601	-.625 1.000			
7	-1.375 0.601	-.625 1.000	0 1.000		
8	-1.125 1.000	-.375 1.000	.25 1.000	.25 1.000	
9	.553571 1.000	1.30357 0.885	1.92857 0.096	1.92857 0.096	1.67857 0.247

TRATAMIENTO = 1 TIEMPO = 2

Summary for variables: cl
by categories of: pgf

pgf	N	mean	sd	p50
4	8	11.125	1.552648	11
5	8	11.625	1.685018	11.5
6	8	7.875	1.246423	8
7	8	8	.7559289	8
8	8	7.5	.7559289	8
9	7	12.14286	1.214986	12
Total	47	9.659574	2.286792	9

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	176.071049	5	35.2142097	22.39	0.0000
Within groups	64.4821429	41	1.57273519		
Total	240.553191	46	5.22941721		

Bartlett's test for equal variances: chi2(5) = 7.1091 Prob>chi2 = 0.213

Comparison of cl by pgf (Bonferroni)					
Row Mean- Col Mean	4	5	6	7	8
5	.5 1.000				
6	-3.25 0.000	-3.75 0.000			
7	-3.125 0.000	-3.625 0.000	.125 1.000		
8	-3.625 0.000	-4.125 0.000	-.375 1.000	-.5 1.000	
9	1.01786 1.000	.517857 1.000	4.26786 0.000	4.14286 0.000	4.64286 0.000

TRATAMIENTO = 2 TIEMPO = 0

Summary for variables: cl
by categories of: pgf

pgf	N	mean	sd	p50
4	8	9.125	1.125992	9
5	7	9.142857	2.035401	9
6	8	11.375	.7440238	11.5
7	8	11.875	1.807722	12
8	7	11.14286	.8997354	11
9	7	7.142857	1.46385	7
Total	46	10.02222	2.126552	10

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	120.781349	5	24.1562698	12.05	0.0000
Within groups	78.1964286	39	2.00503663		
Total	198.977778	44	4.52222222		

Bartlett's test for equal variances: chi2(5) = 8.9482 Prob>chi2 = 0.111

Comparison of cl by pgf (Bonferroni)					
Row Mean- Col Mean	4	5	6	7	8
5	.017857 1.000				
6	2.25 0.044	2.23214 0.062			
7	2.75 0.006	2.73214 0.009	.5 1.000		
8	2.01786 0.134	2 0.177	-.232143 1.000	-.732143 1.000	
9	-1.98214 0.151	-2 0.177	-4.23214 0.000	-4.73214 0.000	-4 0.000

TRATAMIENTO = 2 TIEMPO = 1

Summary for variables: cl
by categories of: pgf

pgf	N	mean	sd	p50
4	8	10	.7559289	10
5	7	11	.5773503	11
6	8	9.5	.9258201	9.5
7	8	9.75	1.035098	10
8	7	9.571429	1.133893	9
9	7	9.714286	1.496026	10
Total	45	9.911111	1.083392	10

TRATAMIENTO = 2 TIEMPO = 2

Summary for variables: cl
by categories of: pgf

pgf	N	mean	sd	p50
4	8	11.5	1.603667	11.5
5	7	11.14286	2.035401	12
6	8	7.875	.6408699	8
7	8	8	.9258201	8
8	7	7.714286	.7559289	8
9	7	11.42857	.9759001	11
Total	45	9.577778	2.126582	9

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	138.102778	5	27.6205556	17.70	0.0000
Within groups	60.875	39	1.56089744		
Total	198.977778	44	4.52222222		

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(5) = 12.4356$ Prob> $\chi^2 = 0.029$

Comparison of cl by pgf
(Bonferroni)

Row Mean- Col Mean	4	5	6	7	8
5	-.357143 1.000				
6	-3.625 0.000	-3.26786 0.000			
7	-3.5 0.000	-3.14286 0.000	.125 1.000		
8	-3.78571 0.000	-3.42857 0.000	-.160714 1.000	-.285714 1.000	
9	-.071429 1.000	.285714 1.000	3.55357 0.000	3.42857 0.000	3.71429 0.000

PROGESTERONA

TIEMPO =1 TRATAMIENTO = 1

PGF	mean	p50	sd
4	.4709125	.3252	.2784647
5	1.874687	1.8044	.4829157
6	7.571675	7.408	3.601739
7	10.93408	11.427	4.422644
8	9.385075	8.1627	4.823421
Total	6.047285	5.3871	5.261309

TIEMPO = 2 TRATAMIENTO = 1

PGF	mean	p50	sd
4	1.3373	1.1767	.5078953
5	6.539425	6.0929	2.983382
6	1.767375	1.5828	.7347812
7	.6975	.8109	.2592273
8	.314175	.25785	.1758677
Total	2.167915	1.0535	2.669605

TIEMPO = 1 TRATAMIENTO = 2

PGF	mean	p50	sd
4	.4567375	.57045	.2436993
5	2.957814	1.9625	2.022755
6	9.196638	8.46015	2.652284
7	10.14184	9.10305	3.819434
8	6.315743	6.6975	1.632589
Total	5.8757	5.9615	4.41747

TIEMPO = 2 TRATAMIENTO = 2

PGF	mean	p50	sd
4	2.262338	1.93115	.9305159
5	4.148686	3.5965	2.359402
6	1.54665	1.602	.4366814
7	.7602286	.3182	.7100864
8	.2720714	.353	.169344
Total	1.803751	1.5351	1.737983

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	1164.46772	4	291.116929	33.33	0.0000
Within groups	637.699059	73	8.73560354		
Total	1802.16678	77	23.4047633		

Bartlett's test for equal variances: chi2(4) = 72.0940 Prob>chi2 = 0.000

One-way analysis of variance by ranks (Kruskal-Wallis Test)

PGF	Obs	RankSum	RankMean
4	8	36.00	4.50
5	8	107.00	13.38
6	8	202.00	25.25
7	8	249.00	31.12
8	8	226.00	28.25

Chi-squared (uncorrected for ties) = 29.402 with 4 d.f. (p = 0.00010)
 Chi-squared (corrected for ties) = 29.402 with 4 d.f. (p = 0.00010)

Multiple comparisons between groups

(Adjusted p-value for significance is 0.002500)

Ho: progesterona(PGF==1) = progesterona(PGF==2)
 RankMeans difference = 8.88 Critical value = 16.41
 Prob = 0.064465 (NS)

Ho: progesterona(PGF==1) = progesterona(PGF==3)
 RankMeans difference = 20.75 Critical value = 16.41
 Prob = 0.000193 (S)

Ho: progesterona(PGF==1) = progesterona(PGF==4)
 RankMeans difference = 26.62 Critical value = 16.41
 Prob = 0.000003 (S)

Ho: progesterona(PGF==1) = progesterona(PGF==5)
 RankMeans difference = 23.75 Critical value = 16.41
 Prob = 0.000024 (S)

Ho: progesterona(PGF==2) = progesterona(PGF==3)
 RankMeans difference = 11.88 Critical value = 16.41
 Prob = 0.021098 (NS)

Ho: progesterona(PGF==2) = progesterona(PGF==4)
 RankMeans difference = 17.75 Critical value = 16.41
 Prob = 0.001196 (S)

Ho: progesterona(PGF==2) = progesterona(PGF==5)
 RankMeans difference = 14.88 Critical value = 16.41
 Prob = 0.005467 (NS)

Ho: progesterona(PGF==3) = progesterona(PGF==4)
 RankMeans difference = 5.88 Critical value = 16.41
 Prob = 0.157426 (NS)

Ho: progesterona(PGF==3) = progesterona(PGF==5)
 RankMeans difference = 3.00 Critical value = 16.41
 Prob = 0.303892 (NS)

Ho: progesterona(PGF==4) = progesterona(PGF==5)
 RankMeans difference = 2.88 Critical value = 16.41
 Prob = 0.311411 (NS)